Zur bakteriellen Verwertbarkeit von Tetralin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Anselm Schreiber
aus Havelberg

Bochum 1981

Zur bakteriellen Verwertbarkeit von Tetralin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Anselm Schreiber
aus Havelberg

Bochum 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis Seite

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL und METHODEN 8

1. Organismen 8

2. Medien 8

3. Isolierung von Bakterien 10

3.1. Direkte Isolierung 10

3.2. Isolierung nach Voranreicherung in der Flüssigkultur 10

3.3. Isolierung nach Voranreicherung im Exsiccator 11

4. Taxonomische Bestimmungen 11

5. Aufbewahrung und Reinheitskontrollen 11

6. Anzucht von Bakterien 12

7. Dosierung von Kohlenwasserstoffen 14

7.1. Zugabe zu festen Nährböden 14

7.2. Zugabe zu Flüssigkulturen 14

8. Messung der Substratzufuhr und Substratabnahme 15

9. Messung des Bakterienwachstums 15

10. Isolierung von bakteriellen Metaboliten 16

11. Qualitative und quantitative Bestimmung von bakteriellen Metaboliten 17

11.1. Gaschromatographie 17

11.2. UV-Photometrie 17

12. Chemikalien 18

III. EXPERIMENTE und ERGEBNISSE 19

1. Analytische Verfahren zum Nachweis des bakteriellen Abbaus von Tetralin und anderen Kohlenwasserstoffen 19

1.1. Gaschromatographische Bestimmung von Tetralin-oxidationsprodukten in Kulturextrakten 22

1.2. Extraktion von Metaboliten mit Hilfe von Sep-Pak-C_{18}-Kartuschen 25

1.3. Bestimmung von Tetralin und anderen Kohlenwasserstoffen im Luftstrom 25

1.4. Zusammenfassung der analytischen Verfahren zum Nachweis von Kohlenwasserstoffen und deren Oxidationsprodukten 29

2. Isolierung und Charakterisierung von Kohlenwasserstoffe verwertenden Bakterienstämmen 32

2.1. Versuche zur Isolierung von Tetralin verwertenden Bakterienstämmen 32

Seite

III.2.2. Isolierung von Bakterienstämmen, die aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe verwerten 38

2.3. Charakterisierung der neu isolierten Bakterienstämme 39

2.3.1. Taxonomische Bestimmung 39

2.3.2. Substratverwertungsspektren 41

2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Isolierung und Charakterisierung von Kohlenwasserstoffverwertern 43

3. Aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe als Substrate für das Wachstum von Bakterien 44

3.1. Zellmassegewinnung im Schikanenkolben 44

3.1.1. Wachstum mit flüssigen Kohlenwasserstoffen 45

3.1.2. Wachstum mit dampfförmig zugeführten Kohlenwasserstoffen 49

3.1.3. Wachstum mit festen Kohlenwasserstoffen 52

3.2. Zellmassegewinnung im Fermenter 56

3.2.1. Entwicklung eines neuen mechanischen Entschäumers 59

3.2.2. Wachstum mit flüssigen Kohlenwasserstoffen 63

3.2.3. Wachstum mit dampfförmig zugeführten Kohlenwasserstoffen 67

3.3. Zusammenfassung der versuchstechnischen und physiologischen Bedingungen für die Untersuchung der bakteriellen Tetralinoxidation 69

4. Tetralin als Substrat für Kohlenwasserstoffe verwertende Bakterien 70

4.1. Einfluß von Tetralin und Tetralinoxidationsprodukten auf Kohlenwasserstoffe verwertende Bakterien 71

4.1.1. Bestimmung der Lebendzellzahl in Gegenwart verschiedener Tetralinkonzentrationen 71

4.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl in Gegenwart von Tetralol-1 und Tetralon-1 74

4.1.3. Wachstumsversuch mit Tetralin als alleiniger Kohlenstoffquelle 76

4.2. Tetralin als Cosubstrat für Alkane verwertende Bakterien 79

4.2.1. Versuche zur Tetralinoxidation durch Ruhezellen 79

4.2.2. Versuche zur Tetralinoxidation durch wachsende Zellen 81

4.2.3. Nachweis von Octanol-1 als Metabolit der Octanoxidation 82

4.3. Tetralin als Cosubstrat für Arene verwertende Bakterien 84

4.3.1. Verwertung von Tetralin in Gegenwart von Naphthalin 84

4.3.2. Bildung von Tetralol-1 und Tetralon-1 in Gegenwart von Salicylat 86

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse mit Tetralin als Substrat für Kohlenwasserstoffverwerter 92

IV. DISKUSSION 92

V. ZUSAMMENFASSUNG 107

VI. LITERATUR 108

VII. ANHANG 122

Abkürzungen

A	Absorption
GK	Gerätekombination
Me-	Methyl-
NB	Nährbouillon
NS	Nährsalz
-OH	Hydroxy-
OD	Optische Dichte
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
TBY	Trypton-Hefeextrakt
T-2-COOH	Tetralin-2-carbonsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Y(s)	(Substrat-)Ertragskoeffizient[102]

Definition

A r e n e - beliebige aromatische Kohlenwasserstoffe mit mindestens e i n e m Benzolring

I. EINLEITUNG

Angesichts zweier Energiekrisen innerhalb eines Jahrzehnts und zunehmender Ausbeutung unserer Rohstoffreserven stehen die Kohlenwasserstoffe im Mittelpunkt des politischen und ökonomischen Interesses. Fossile Rohstoffe sollen nach Möglichkeit weniger als Primärenergie eingesetzt, sondern mehr zu hochwertigen chemischen Synthesekomponenten oder pharmazeutischen Produkten v e r e d e l t werden.

Bei den Bemühungen zur Veredelung von Steinkohlen und Steinkohlenprodukten fördert der Steinkohlenbergbau in der BRD auch Untersuchungen zur m i k r o b i e l l e n Veredelung von Steinkohlenteer-Kohlenwasserstoffen. Den größten Anteil der durch Raffination des Steinkohlenteers gewonnenen Kohlenwasserstoffe (s.Abb.1) hat Naphthalin mit ca. 1 Million Tonnen pro Jahr.

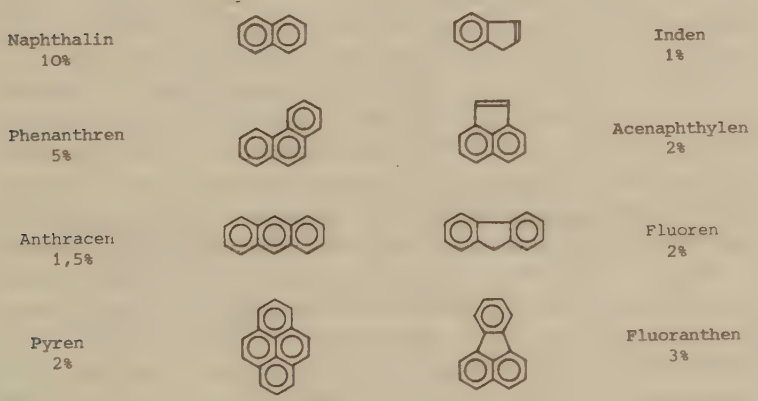


Abb.1: Typische Steinkohlenteer-Kohlenwasserstoffe und deren prozentualer Anteil[14]

Durch partielle Hydrierung erhält man hieraus Tetralin (1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin), bekannt unter der Bezeichnung Terpentinersatz. Es wird vor allem als Lösungsmittel für Harze, Fette, Öle und Lacke verwendet. Daneben sind einige Oxidationsprodukte des Tetralins sehr wertvoll: Tetralol-1, Tetralon-1 und andere Derivate sind Ausgangsstoffe für die Synthese von Insektiziden und Pharmaka (s.Abb.2).

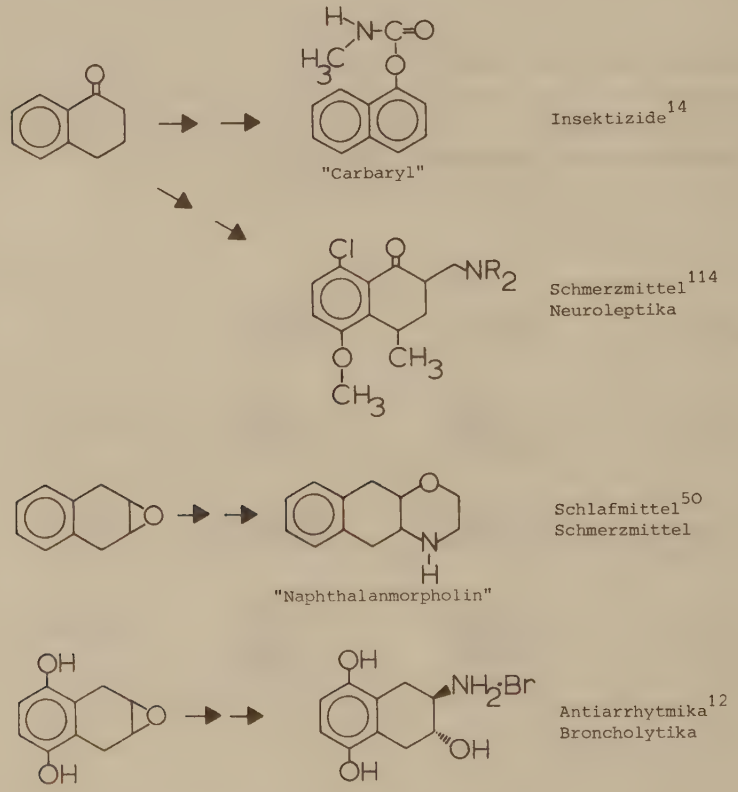


Abb.2: Beispiele für die Verwendung von Tetralin-Oxidationsprodukten als Bausteine für die industrielle Synthese von Insektiziden und Pharmaka

Die Erfolge der Biotechnologie bei der Steroidumwandlung[57,101] und der Gewinnung von Salicylsäure aus Naphthalin[56] gaben den Anlaß zur Untersuchung der folgenden Fragen:

(1) Läßt sich Tetralin durch Biotransformation veredeln?
(2) Kann die Biotransformation mit der chemischen Synthese konkurrieren?

Eingehende Untersuchungen über die mikrobielle Verwertung von Tetralin liegen bisher nicht vor. Die Abbauwege für n-Alkane wie Octan[4] oder Hexadecan[105,106] sowie für Arene wie Benzol[36,62,116] oder Naphthalin[17] sind ausführlich untersucht. Die beteiligten Enzyme und deren Produkte sind bekannt[6,35,39,70] (siehe Abb.3, S.4). C y c l o a l k a n e, wie Cyclohexan oder Decalin und das teils alicyclische, teils aromatische Tetralin, scheinen dagegen relativ persistent zu sein[96,97,109]. In vielen Untersuchungen haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen vergeblich bemüht, Mikroorganismen zu isolieren, die in Reinkultur Cyclohexan[7,8,18,19,71,109], Cyclopentan[59] oder Decalin[76,77] als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Die wenigen positiven Ergebnisse bakteriellen Wachstums mit Cyclopentan und Cyclohexan von Tausz und Peter[107], Fredricks[29] sowie Skarzynsky und Czekalowski[95] waren entweder später nicht nachvollziehbar oder auf nicht beachtete Verunreinigungen des Substrats zurückzuführen[54,109]. Imelik[49] berichtete über das Wachstum von Pseudomonas aeruginosa mit Cyclohexan und Colla und Treccani[13] wiesen Adipin- und Pimelinsäure beim Wachstum eines Flavobacteriums sowie eines anderen, nicht näher charakterisierten Bakerienstammes auf Decalin nach. Beide Untersuchungen wurden jedoch nicht fortgesetzt. Der Stamm von Colla und Treccani war zu vergleichenden Untersuchungen nicht erhältlich[75]. Erst kürzlich isolierten Anderson et al.[1] und Stirling et al.[100] zwei Stämme der Gattungen Pseudomonas bzw. Nocardia, die mit Cyclohexan als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Der Nocardia Stamm benötigt Biotin als Supplement.

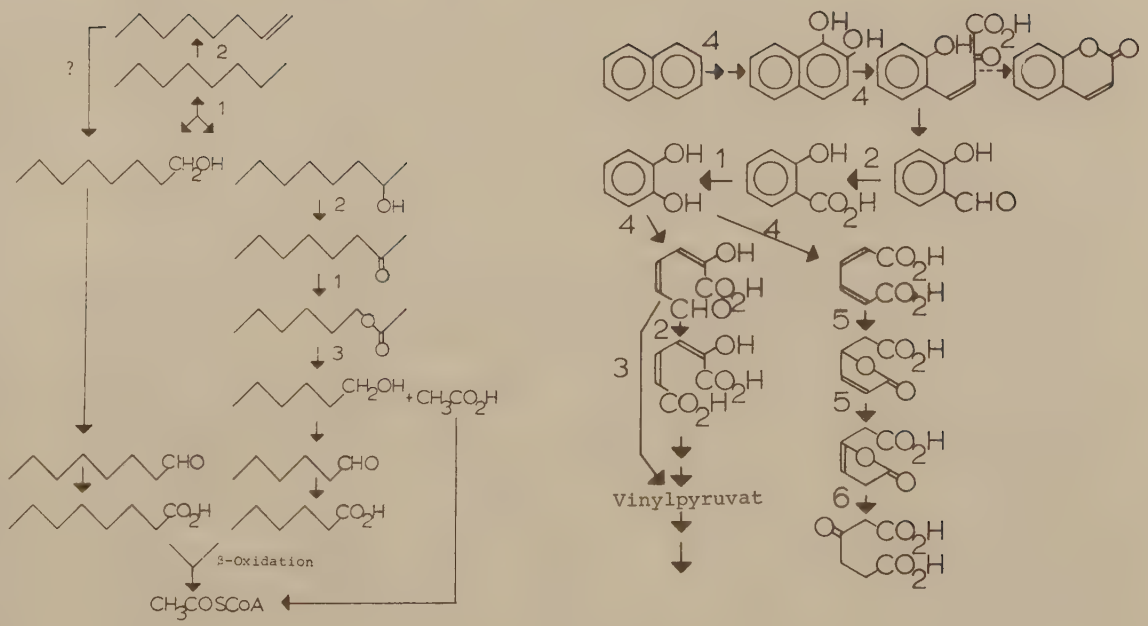


Abb.3: Bakterieller Abbau von Alkanen [35] und Arenen (z.B. Naphthalin[6])

1 Monooxygenase
2 Dehydrogenase
3 Hydrolase
4 Dioxygenase
5 Isomerase
6 Lactonase

Tetralin steht infolge seiner Struktur zwischen den alicyclischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen. Ein mikrobieller Angriff ist vor allem an der aromatischen Seite des Moleküls zu vermuten, da eine Vielzahl von Arenen und Arenderivaten durch prokaryotische und eukaryotische Mikroorganismen oxidiert wird[34]. So zeigten Hosler und Eltz[46], daß Tetralin den Abbau von p-Xylol zu 2,5-Dimethylmuconsäure durch Nocardia salmonicolor A-100 induziert. Leider wurde nicht geprüft, ob Tetralin auch umgesetzt wird. Ladd[60] konnte keine Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von Tetralin durch Zellen von Corynebacterium feststellen. Alcaligenes Stamm 559 verwertet zwar n-Octylbenzol, Biphenyl und Diphenylmethan, aber nicht Tetralin als Wachstumssubstrat[110]. Lediglich Soli und Bens[96,97] fanden unter 16 getesteten Stämmen 6, die Tetralin im Gemisch mit 18 anderen aliphatischen, alicyclischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen geringfügig zu verwerten schienen. Allerdings blieb offen, ob Tetralin nicht lediglich von den Zellen adsorbiert wurde.

Die einzigen bisher bekannten Produkte einer mikrobiellen Verwertung von Tetralin sind in Abb.4 aufgeführt.

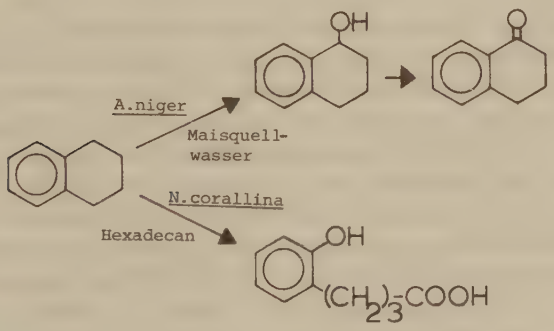


Abb.4: Produkte des mikrobiellen Tetralinabbaus nach Ganapathy et al.[31] und Jamison et al.[51]

Ein Ringspaltungsprodukt des alicyclischen Tetralinrings entdeckten Jamison et al.[51] bei Cooxidationsversuchen mit Nocardia corallina V-49. Tetralol-1 und Tetralon-1 fanden Ganapathy et al.[31] bei ihren Arbeiten zum Mechanismus der Transformation von Terpenen durch Aspergillus niger NCIM 612.

In der vorliegenden Arbeit sollten Tetralin verwertende Bakterienstämme isoliert werden. Mit diesen sollte, unter Verwendung herkömmlicher Methoden zur Bestimmung von Abbauwegen[16], Intermediate des Abbaus von Tetralin isoliert und charakterisiert werden. Durch Mutagenisierung der Bakterien könnte im nächsten Schritt versucht werden, Blockmutanten zu isolieren, die interessante Metabolite akkumulieren[52].

In Kenntnis der vielen vergeblichen Versuche anderer Arbeitsgruppen, Bakterienstämme zu isolieren, die mit Cycloalkanen als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, sollte auch nach Bakterien gesucht werden, die Tetralin als Cosubstrat nur teilweise abbauen. Jamison et al.[51] hatten bereits mit Nocardia corallina V-49, einem Hexadecanverwerter, ein Ringspaltungsprodukt von Tetralin nachgewiesen (siehe Abb.4, S.5). Bei dieser "Cooxidation" genannten Technik[61,27] oxidierten mit Hexadecan wachsende Bakterienzellen das Cosubstrat Tetralin zu 4-Phenyl-(2'-hydroxy)-buttersäure. Andere Autoren zeigten, daß Cyclopentan und dessen Homologen bis zum Cyclooctan durch bakterielle Monooxygenasen zu den korrespondierenden Alkoholen[112] und Ketonen[71] oxidiert wurden. Hier wurden Mycobacterium vaccae JOB 5 und Pseudomonas aeruginosa 473, die nicht mit Cycloalkanen wuchsen, mit 2-Methylbutan bzw. Heptan angezogen. Neben den Bakterien, die Cycloalkane mit Hilfe von Monooxygenasen[51,66,109,112] cooxidieren, erschienen auch Aromatenverwerter für die Cooxidation von Tetralin (siehe Abb.5, S.7) geeignet. Ein breites Spektrum von Arenen wird von Dioxygenasen oxidiert[34]. Wegen der strukturellen Verwandtschaft kamen vor allem Naphthalinverwerter infrage. Schließlich sollte noch ein Campherverwerter isoliert werden. Hartline und Gunsalus[41] zeigten nämlich, daß die Methylenhydroxylase auch durch Bornan induziert wird. Als minimale Forderung an die Struktur von Induktoren des Enzyms wurde ein Bicyclus mit einem 5- oder 6-Ring gefordert. Dazu könnte auch Tetralin gerechnet werden.

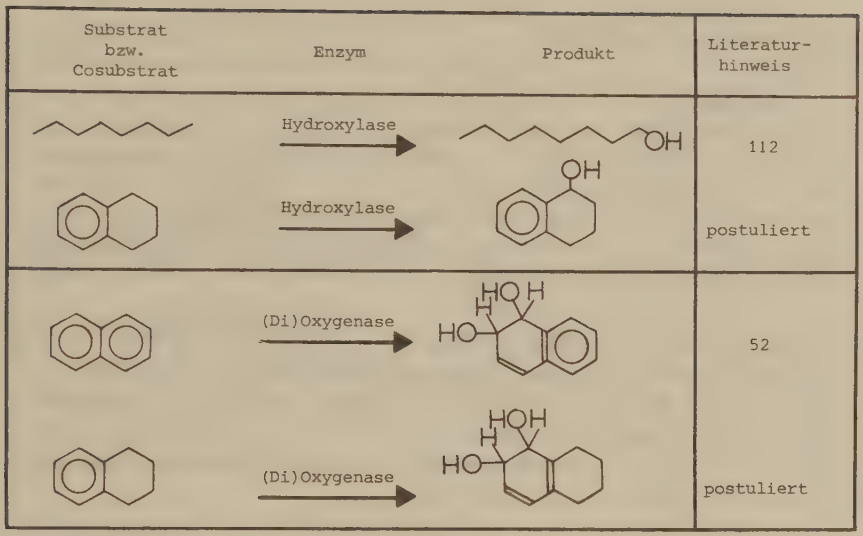


Abb.5: Postulierte Cooxidation von Tetralin durch bakterielle Oxygenasen

Einewichtige Voraussetzung für die Untersuchung des bakteriellen Abbaus von Tetralin war die Entwicklung geeigneter Untersuchungsmethoden. Dabei waren die chemischen und physikalischen Besonderheiten des Tetralins und anderer Kohlenwasserstoffe im Vergleich mit gewöhnlichen, wasserlöslichen Substraten zu berücksichtigen. Die Abbauprodukte (Metabolite) sollten quantitativ bestimmt werden, um gegebenenfalls eine Optimierung der Produktbildung zu ermöglichen. Danach sollte die Frage beantwortet werden: Werden beim bakteriellen Abbau von Tetralin wirtschaftlich interessante Produkte, wie z.B. Tetralol-1 und Tetralon-1, gebildet?

II. MATERIAL und METHODEN

1. Organismen

Die Untersuchungen wurden mit neu isolierten Bakterienstämmen durchgeführt, die Kohlenwasserstoffe als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Die Bakterienstämme wurden mit dem Computer-Codiersystem "Oxi/Ferm" der Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, vorläufig taxonomisch bestimmt.

Dr. A.M. Chakrabarty, Schenectady, USA, stellte die Plasmid tragenden Stämme Pseudomonas aeruginosa Xyl^+, P.aeruginosa Tol^+, P.aeruginosa $Dodecan^+$ $Hexadecan^+$, P.putida Sal^+ sowie P.putida Trp^- Oct^+ zur Verfügung (s. Friello et al.[30]; im Begleitschreiben wurden keine Stamm-Nummern, sondern nur die Phänotypen angegeben - nähere Erläuterungen siehe Tab.4, S.33).

Außerdem wurden zehn noch nicht näher bestimmte, von Dr. W. Reineke, Universität Göttingen, isolierte Bodenbakterien-Stämme in Vorversuchen eingesetzt. Escherichia coli K12 entstammte der Stammsammlung des Lehrstuhls.

2. Medien

Für die Herstellung von F l ü s s i g k u l t u r e n wurden die jeweils getrennt sterilisierten Nährsalz-, Puffer- und Substratlösungen zusammenpipettiert. Die wäßrigen Lösungen wurden im Autoklaven 20 min bei 120°C sterilisiert. Flüssige Kohlenwasserstoffe und temperaturempfindliche Lösungen wurden durch sterile Membranfilter, 0,2 m^{-6} Porenweite, filtriert. Durch Zugabe von Agar Difco (1,5%) wurden f e s t e N ä h r b ö d e n hergestellt. Bei Minimalagar mit Kohlenwasserstoffen als Kohlenstoffquelle mußten Glaspetrischalen verwendet werden. Kunststoffpetrischalen waren gegen die verwendeten Kohlenwasserstoffe nicht inert.

Die folgenden Lösungen wurden verwendet:

Nährsalzlösung 1 (NS1) und Pufferlösung: nach Dorn et al.[20]

Die aus der NS1-Lösung, der Pufferlösung und dem Substrat (s.u.) zusammengesetzte N ä h r l ö s u n g wurde für Wachstums- und Cooxidationsversuche verwendet (siehe III.3. und 4.; S.44ff). Die Bakterienanreicherungs- und Isolierungsversuche wurden ebenfalls mit dieser Lösung, sowie zusätzlich mit den folgenden durchgeführt (siehe III.2.; S.32ff):

Nährsalzlösung 2 (NS2):

Nährsalzlösung 1 supplementiert mit 3 ml Vitaminlösung auf 1000 ml

Nährsalzlösung 3 (NS3):

Nährsalzlösung 1 supplementiert mit 0,5 g Hefeextrakt
und 0,5 g Pepton auf 1000 ml

Nährsalzlösung 4 (NS4): nach Kiyohara et al.[58]

Vitaminlösung: nach Schlegel[88]

Substratlösungen:

Von wasserlöslichen Kohlenstoffquellen wurden 1 M Stammlösungen hergestellt. Die Konzentration im Medium betrug, wenn nicht anders angegeben, 10^{-2} M. Organische Säuren wurden als Natriumsalze in Lösung gebracht. In Wasser schwerlösliche Kohlenwasserstoffe wurden den Medien fest oder flüssig zugesetzt oder, wie in II.7 (S.14) beschrieben, über die Gasphase zugeführt.

Nährbouillonlösung (NB):

Nutrient Broth (Difco)	8 g
NaCl	5 g
destilliertes Wasser	ad 1000 ml, pH 7,0

Trypton-Hefeextrakt-Lösung (TBY): nach Winkler et al.[117]

Gelatinestichagar:

Gelatine	10,0 g
Nutrient Broth	1,6 g
NaCl	0,5 g
destilliertes Wasser	ad 100 ml

Glycerin-Gefrierkulturen:

NaCl	5 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
destilliertes Wasser	500 ml
Gylcerin	500 ml

3. Isolierung von Bakterien

3.1. Direkte Isolierung

Die zu untersuchende Boden- oder Wasserprobe wurde in Phosphatpuffer suspendiert und auf Agar ausgestrichen. Der Agar enthielt nur die selektive Kohlenstoffquelle und Nährsalze. Die Isolierung von Bakterienstämmen erfolgte durch wiederholtes Überimpfen auf Selektivagar, solange bis eine Reinkultur vorlag. Zur Kontrolle wurde auf Platten ohne Kohlenstoffquelle überimpft. Die Reinheit der Bakterienstämme wurde überprüft durch Ausstrich auf TBY-Agar.

3.2. Isolierung nach Voranreicherung in der Flüssigkultur

Von den zu untersuchenden Erd- und Wasserproben wurden 1 bis 3 g bzw. 2 bis 4 ml zu 30 ml Nährlösung gegeben, mit der selektiven Kohlenstoffquelle versehen und wie in II.6 (S.12) beschrieben, im Erlenmeyerkolben auf dem Rotationsschüttler bei 30°C und 170 U/min inkubiert. Die Verwertung der selektiven Kohlenstoffquelle wurde in bestimmten Zeitabständen durch Plattieren der Suspension auf Minimalagar getestet. Gleichzeitig wurden die Anreicherungskulturen

mikroskopisch kontrolliert. Durch Überimpfen der Flüssigkulturen in Abständen von 2 bis 6 Tagen wurde versucht, nicht wachsende Bakterien sowie störende Metabolite auszuverdünnen. Die Isolierung von Bakterien erfolgte durch weitere Anreicherung in einer Flüssigkultur oder im direkten Verfahren (siehe II.3.1, S.10).

3.3. Isolierung nach Voranreicherung im Exsiccator

Mehrere Erd- und Wasserproben verschiedener Herkunft wurden in einem Exsiccator gut durchmischt und nach Zugabe der selektiven Substrate bei Raumtemperatur aufbewahrt. Durch einen Magnetrührer konnte der Schlamm teilweise in Bewegung gehalten werden. In Abständen von 2 Tagen wurde Frischluft zugeführt. Wenn der Substratgeruch nachließ, wurde neues Substrat zugegeben. Die Isolierung von Bakterien erfolgte wie in II.3.1. und 2. (S.10) beschrieben.

4. Taxonomische Bestimmungen

Einige biochemische Merkmale der neu isolierten Bakterienstämme wurden mit Hilfe von "Oxi/Ferm-Tubes" (Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) untersucht. Die vom Hersteller empfohlenen Zusatzreaktionen wurden ebenfalls durchgeführt. Danach konnte anhand eines Computer-Codier-Systems eine vorläufige taxonomische Einordnung der Bakterienstämme vorgenommen werden.

In Anlehnung an die Methoden von Stanier et al.[99] wurden Substratverwertungstests mit Agarplatten und Flüssigkulturen durchgeführt.

5. Aufbewahrung und Reinheitskontrollen

Die Bakterienstämme wurden in Glycerin-Gefrierkulturen bei -25°C aufbewahrt. Stammplatten mit selektiven Kohlenstoffquellen wurden bei 4°C aufbewahrt und alle 2 bis 4 Wochen überimpft. Die Reinheit der Kulturen wurde durch Ausstreichen auf Selektivagar und TBY-Agar, sowie durch mikroskopische Kontrolle überprüft.

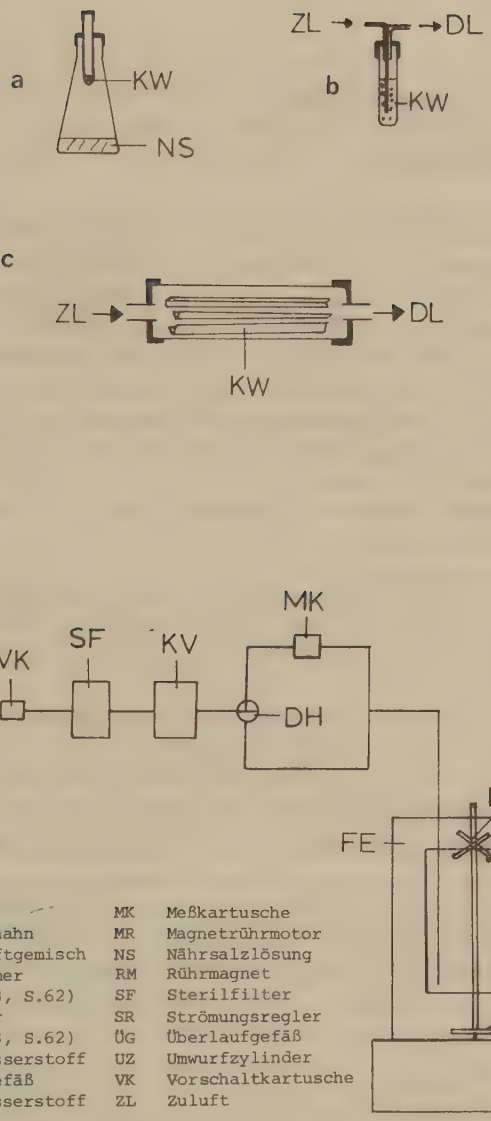
6. Anzucht von Bakterien

Kleine Zellmengen wurden in Reagenzgläsern (2 bis 5 ml Medium) angezogen. Um besonders bei langen Inkubationszeiten die Verflüchtigung von Kohlenwasserstoffen und Wasser zu vermeiden, wurden die Schikanenkolben mit dicht schließenden Schraubkappen ausgestattet. Die Kulturen wurden bei 30°C auf einem Rollbebrüter bzw. einem Rotationschüttler mit 170 U/min inkubiert.

Für die Anzucht mit dampfförmig zugeführten Substraten in 50 bis 250 ml Medium wurden Glaszylinder mit 4 cm Durchmesser und 30 cm Länge (Blasensäulen) verwandt. Das Substrat-Luft-Gemisch wurde durch ein Rohr zum Boden des Kulturgefäßes geleitet und entwich dort über eine Fritte.

Größere Zellmengen wurden in 1- und 3,8 l-Fermentern der Firmen Ochs, Bovenden und Schütt, Göttingen, angezogen. Ein externer Magnetrührer (siehe Abb.6d, S.13) trieb die mit Magneten versehenen Rühraggregate an (500 bis 1000 U/min). Die Fermenter waren mit einem selbst entwickelten mechanischen Entschäumer ausgestattet (siehe Abb.23, S.62)[10,11]. Die Kulturen wurden mit 1 bis 20% des Gesamtvolumens angeimpft und bei 30°C mit maximal 1 l pro Minute und Liter Kulturvolumen belüftet. Die Strömungsraten wurden mit Durchflußreglern der Fa. Brooks Instruments, Veenendaal, Niederlande, Modell 8944, eingestellt und mit Strömungsmessern der Fa. Rota, Wehr/Baden, kontrolliert.

Die Zellen wurden mit einer Sorvall-Zentrifuge, Modell RC-2B bei 23000 xg geerntet. Wenn sich bei der Zellernte noch Reste des Kohlenwasserstoffs in der Kultur befanden, ließen sich nur ca. 66% der Zellen sedimentieren. Nach Zugabe von 10% des Lösungsmittelgemischs Ethanol/Butanol/Chloroform (10:10:1) konnten fast alle Zellen sedimentiert werden; 99% der Zellen verloren dabei jedoch ihre Keimfähigkeit. Daher wurde dieses Verfahren nur in bestimmten Vorversuchen angewendet.



AL	Abluft	MK	Meßkartusche
DH	Dreiwegehahn	MR	Magnetrührmotor
DL	Dampf-Luftgemisch	NS	Nährsalzlösung
ES	Entschäumer (s.Abb.23, S.62)	RM	Rührmagnet
		SF	Sterilfilter
FE	Fermenter (s.Abb.23, S.62)	SR	Strömungsregler
		ÜG	Überlaufgefäß
KV	Kohlenwasserstoff vorratsgefäß	UZ	Umwurfzylinder
		VK	Vorschaltkartusche
KW	Kohlenwasserstoff	ZL	Zuluft

Abb.6 Vorrichtungen zur Eintragung und Messung von dampfförmigen Kohlenwasserstoffen in Schikanenkolben (a) und Kleinfermentern (b,c und d)

7. Dosierung von Kohlenwasserstoffen

7.1. Zugabe zu festen Nährböden

Minimalagarplatten mit Kohlenwasserstoffen, Campher oder Coumarin als Kohlenstoffquelle wurden in geschlossenen Glaszylindern bebrütet. Die Kulturen wurden über die Dampfphase gefüttert, indem das Substrat in den Deckel der Glaspetrischalen bzw. Vorratsgefäße neben den Platten gegeben wurde. Bei längeren Inkubationszeiten wurde Substrat nachgefüttert. Die Vorratsgefäße wurden regelmäßig durch neue ersetzt, um eine Verfälschung der Resultate durch Autoxidationsprodukte zu vermeiden. Eine Wasserschale am Boden des Glaszylinders sorgte für die nötige Luftfeuchtigkeit.

7.2. Zugabe zu Flüssigkulturen

Schwer wasserlösliche, feste Substrate wurden in pulverisierter Form zur Kulturflüssigkeit gegeben oder als Dampf mit dem Luftstrom in das Kulturgefäß eingeleitet. Flüssige Kohlenwasserstoffe mit relativ hohem Dampfdruck, wie Heptan oder Octan, wurden in ein Einhängeröhrchen gefüllt, das oberhalb der Kulturflüssigkeit im Schikanenkolben befestigt war. Das Röhrchen und der Kolben waren nach außen mit PTFE-Dichtungen verschlossen. Ein Loch im Einhängeröhrchen sorgte für die Verteilung des Substratdampfes im Kolben (siehe Abb.6a, S.13).

Die Zufuhr einer genau zu dosierenden Menge von leicht flüchtigen Substraten erfolgte über die Zuluft. Flüssige Kohlenwasserstoffe wurden in einer Waschflasche (Abb.6b), Feststoffe in besonderen Glasrohren von der Zuluft aufgenommen (siehe Abb.6c, S.13). Die Feststoffe wurden zuvor in Ether gelöst. Mit dieser Lösung wurden längsseitig gefalzte Filterpapierstreifen mehrmals nacheinander getränkt. Nachdem das Substrat auskristallisiert war, wurden die Streifen in ein Glasrohr geschoben, das über einen PTFE-Schlauch mit dem Kulturgefäß verbunden war (siehe Abb.6d, S.13).

Die Substratzufuhrrate konnte bei Bedarf getrennt von der Luftzufuhrrate geregelt werden. Dazu wurde eine zweite Zuluftleitung separat in die Kultur eingeführt. Materialien aus Silikongummi und PVC sind

durchlässig für viele Kohlenwasserstoffe, teilweise werden sie sogar gelöst. Daher wurden bei allen Versuchen mit Kohlenwasserstoffen anstelle von Silikongummi-Schläuchen und -Dichtungen ausschließlich PTFE-Schläuche und PTFE-ummantelte Dichtungen verwendet.

8. Messung der Substratzufuhr und der Substratabnahme

Die pro Zeiteinheit in Zu- und Abluft enthaltene Menge an Naphthalin oder Tetralin wurde nach Adsorption an Sep-Pak-C_{18}-Kartuschen (Fa. Waters, Königstein/Ts.) photometrisch oder gaschromatographisch bestimmt. Hierzu wurden die Meß-Kartuschen jeweils für 3 bis 5 Minuten über Dreiwegehähne in den Luftstrom eingeschaltet (siehe Abb.6d,S.13). Der Strömungswiderstand der Kartusche führte zu einem Absinken der Strömungsrate. Dies wurde dadurch ausgeglichen, daß grundsätzlich eine Vorschalt-Kartusche ins Strömungssystem geschaltet wurde. Diese befand sich vor dem Kohlenwasserstoffgefäß und wurde während der Meßzeit entfernt. Anschließend wurden die adsorbierten Kohlenwasserstoffe mit 3 ml Methanol oder Chloroform eluiert und ihre Konzentration im Spektralphotometer oder mittels Gaschromatographie bestimmt. Aus der Differenz des Substratgehalts in Zu- und Abluft wurde die Substratabnahme ermittelt.

9. Messung des Bakterienwachstums

Gesamtzellzahl

Die Zellzahl wurde unter Verwendung einer Zählkammer (0,02 mm × 0,0025 mm^2) nach Neubauer (Fa. W. Schreck, Hofheim/Ts.) ermittelt.

Lebendzellzahl

Die Zahl der keimfähigen Zellen wurde durch Plattieren von Zellsuspensionen in geeigneter Verdünnung auf Agarplatten (Nährbouillon- oder Minimalagar) bestimmt.

Zelldichte

Die optische Dichte von Zellsuspensionen wurde an einem Spektralphotometer der Fa. Hitachi, Modell 100-10, Tokyo, Japan, bei einer Wellenlänge von $\lambda = 546$ nm gemessen.

Trockengewicht

Eine Probe (2 bis 10 ml) der Zellsuspension wurde bei 8000 xg zentri-

fugiert, mit 0,9% Kochsalzlösung sowie destilliertem Wasser gewaschen und im Zentrifugenbecher bei 90°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

10. Isolierung von bakteriellen Metaboliten

Der durch Zentrifugation gewonnene Kulturüberstand wurde, wenn saure Komponenten störten, bei pH 9, sonst bei neutralem pH oder, um saure Metabolite zu gewinnen, bei pH 1,5 mit Diethylether dreimal ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit $MgSO_4$ getrocknet und im Rotationsverdampfer eingeengt. Die qualitative und quantitative Analyse der Metabolite erfolgte im Gaschromatographen. Wegen der Säure- und Alkali-Empfindlichkeit von Tetralol-1 wurden die Proben des Kulturüberstandes für die Tetralolbestimmung gegebenenfalls getrennt, bei pH 7.0 bis 7.4, aufgearbeitet. In Proben, die bei pH 9 2 Tage aufbewahrt wurden, trat teilweise Zersetzung ein.

Für die Erstellung von Umsatzkinetiken wurden 10 bis 40 ml der Kultur zentrifugiert und der Überstand durch "Sep-Pak-C_{18}"-Kartuschen gepreßt. Der pH-Wert wurde vorher, wie oben beschrieben, eingestellt. Die Kartuschen wurden anschließend mit 5 ml Puffer gespült, um unerwünschte polare Kulturbestandteile zu entfernen. Danach wurden die adsorbierten Metabolite mit 0,5 bis 2 ml Methanol oder Acetonitril eluiert und gaschromatographisch analysiert.

Die im sauren Extrakt enthaltenen Carbonsäuren wurden mit einer frisch hergestellten Diazomethanlösung methyliert. Diazomethan wurde nach der Vorschrift aus dem Organikum[72] aus Nitrosomethylharnstoff hergestellt. Eine Probe der methanolischen Carbonsäurelösung wurde tropfenweise mit der etherischen Diazomethanlösung versetzt, bis eine schwache Gelbfärbung entstand oder keine Stickstoffentwicklung mehr auftrat. Überschüssiges Diazomethan wurde im Vakuum verdampft.

11. Qualitative und quantitative Bestimmung von bakteriellen Metaboliten

11.1. Gaschromatographie

Die Analyse von Kulturextrakten und Kartuscheneluaten wurde mit folgenden Gerätekombinationen durchgeführt.

A Gerät: Modell 4720 A
Zweikanal-Gaschromatograph mit Flammenionisations-Detektoren (Hewlett-Packard, Avondale, USA)
Integrator: Modell 3370 B (Hewlett-Packard)

B Gerät: Modell HP 5710 A
Zweikanal-Gaschromatograph mit Flammenionisations-Detektoren (Hewlett-Packard)
Integrator: Modell HP 3380 A (Hewlett-Packard)

Verwendete Säulen (Hewlett-Packard):

a Edelstahl-Säule, 24', Silikongummi SE 52

b Edelstahl-Säule, 6', Carbowax 20 M

Die injizierten Probelösungen wurden isotherm oder mit geeigneten Temperaturprogrammen (siehe III.1.1., S.22f) von der Säule eluiert. Die Verdampfer- und Detektortemperatur betrug 250°C, die Strömungsraten: N_2 : H_2 : Luft = 40:30:360 (ml/min). Für quantitative Bestimmungen wurden jeweils Standardlösungen im gleichen Konzentrationsbereich chromatographiert.

11.2. UV-Photometrie

Die UV-Absorptionen wurden mit einem Spektralphotometer der Fa. Hitachi, Tokyo, Japan, Modell 100-10 in Quarzküvetten mit 1 cm Lichtweg gemessen.

12. Chemikalien

Es wurden die handelsüblichen Chemikalien (p.A., soweit lieferbar) der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Spezielle Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich-Europe, Beerse, Belgien: Tetralol-1
Baker, Groß-Gerau: Hexan, Heptan
Fluka, Buchs, Schweiz: 3- und 4-Hydroxybenzoesäure, 3-Methylbenzoesäure, Octan, Octanol-1, Hexadecan
EGA-Chemie, Steinheim: Octanal, Tetralon-1, Tetralon-2, Tetralol-5, Tetralol-6, Tetralin-2-carbonsäure
Sigma, München: 5-Hydroxy-1-tetralon

Von der Bergbau-Forschung GmbH, Essen, wurde zur Verfügung gestellt: Anthracen, Octahydroanthracen, Naphthalin, Tetralin, 2- und 6-Methyltetralin, 2-Isopropyltetralin, 1-/5-Methyltetralin (Isomerengemisch), 2-Isopropylnaphthalin, Phenanthren, Oktahydrophenanthren, Dodekahydrophenanthren, 9,10-Benzophenanthren.

III. EXPERIMENTE und ERGEBNISSE

1. Analytische Verfahren zum Nachweis des bakteriellen Abbaus von Tetralin und anderen Kohlenwasserstoffen

Untersuchungen zum bakteriellen Abbau von Kohlenwasserstoffen müssen die besonderen Eigenschaften dieser Verbindungen im Vergleich mit gewöhnlichen Kohlenstoffquellen, wie Glucose oder Succinat berücksichtigen: Kohlenwasserstoffe lösen sich nur sehr schlecht in Wasser und haben relativ hohe Dampfdrucke (siehe Tab.1 und Abb.7, S.20).

Tab.1: Löslichkeit von Kohlenwasserstoffen in Wasser

Kohlenwasserstoff	Löslichkeit (bei Raumtemperatur) [ppm (w/w)]	[µM]
n-Hexan[a)]	9,5 (±1,3)	110
n-Heptan[a)]	2,93(±0,2)	29,2
n-Octan[a)]	0,66(±0,06)	5,8
n-Dodecan[b)]	0,0018	0,0106
Cyclohexan[a)]	55,0	654
Naphthalin[b)]	31,3	240
Tetralin[c)]	15,4	116

a) McAuliffe[65]; b) Shaw[94]; c) Bestimmung in NS1-Lösung (siehe II.10., S.16)

Das Versuchssystem besteht daher aus 4 Phasen, der d a m p f f ö r m i g e n, der flüssigen h y d r o p h i l e n, der flüssigen oder festen h y d r o p h o b e n und der f e s t e n Phase (Bakterien). Konventionelle Verfahren zur Ermittlung von bakteriellen Abbauwegen beruhen in erster Linie auf der Untersuchung der e x t r a zellulären Vorgänge, d.h. der Analyse der wäßrigen Flüssigphase[16]. In Anbetracht der in Abb.8 (siehe S.21) schematisch dargestellten Phasenverteilung sowie der Hinweise aus der Literatur waren in dieser Arbeit beträchtliche Komplikationen zu erwarten[47].

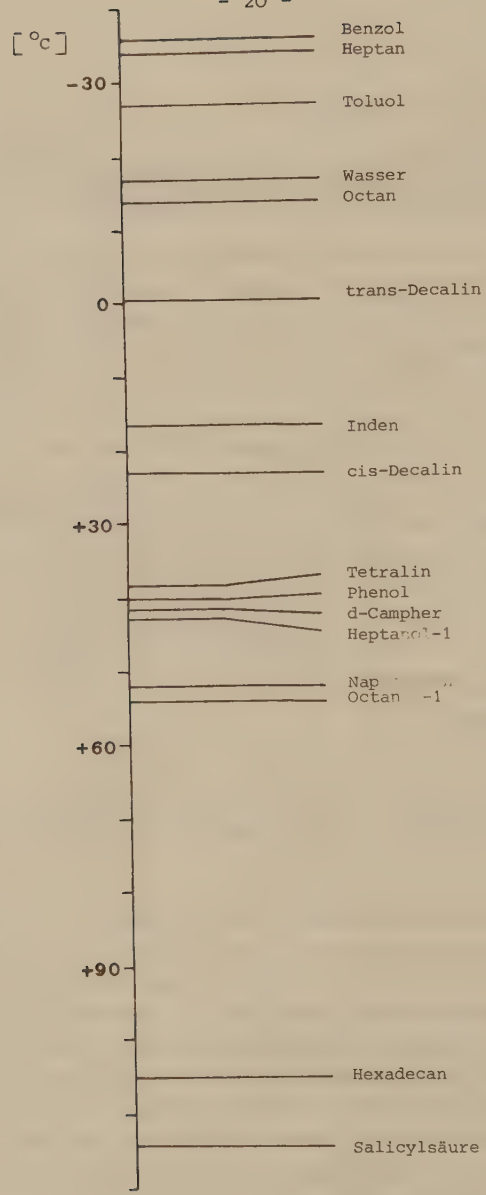


Abb.7: Flüchtigkeit von Kohlenwasserstoffen[113]

Die Stellung auf der Temperaturskala gibt an, wann die jeweiligen Kohlenwasserstoffe den Dampfdruck von 1 Torr haben. Je niedriger die Temperatur desto höher ist die Flüchtigkeit.

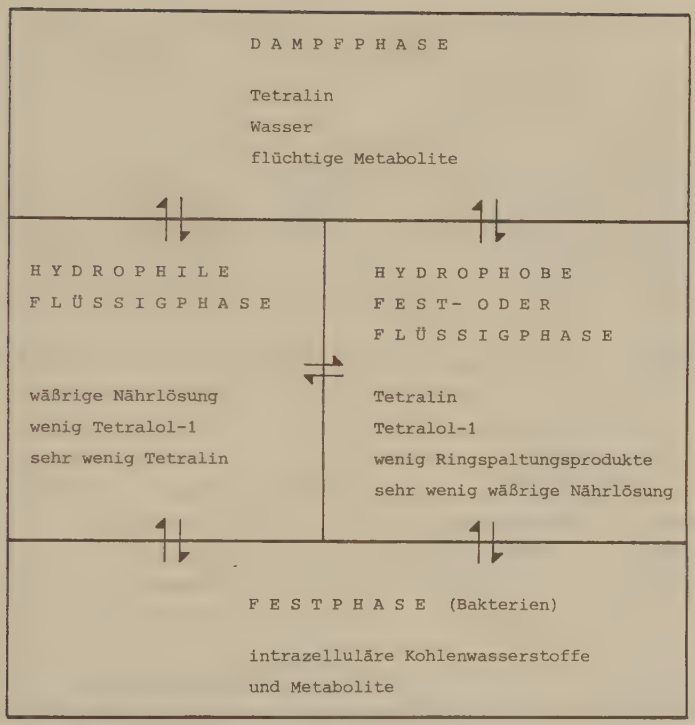


Abb.8: Phasenverteilung bei Experimenten zum bakteriellen Abbau von Kohlenwasserstoffen (z.B. Tetralin)

In Vorversuchen zur Cooxidation von Tetralin wurden Kulturüberstände nach bekannten Methoden mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert (siehe II.10., S.16). Der Extrakt mußte vor der gaschromatographischen Analyse im Rotationsverdampfer eingeengt werden. Dabei wurden Tetralol-1 und Tetralon-1 gegenüber Tetralin infolge ihrer unterschiedlichen Dampfdrucke überproportional angereichert. Eine quantitative Bestimmung der Substratabnahme und der Produktbildung auf diese Weise war deshalb nicht möglich (siehe Tab.9, S.80).

Es mußte das Ziel der Analytik sein, bei Cooxidationsversuchen in

e i n e r Probe gleichzeitig die Konzentration des Substrats u n d der Produkte nachzuweisen. Aus den oben dargestellten Problemen der Phasenverteilung und aus Versuchen ergaben sich 2 für die Probenaufarbeitung kritische Schritte: (1) die Entnahme von Proben aus mehrphasigen Systemen und (2) das Einengen von Extrakten, die aus Komponenten mit sehr unterschiedlicher Flüchtigkeit zusammengesetzt sind. Im erstgenannten Schritt konnte nicht, entsprechend einer von Mrsny et al.[68] beschriebenen Methode, ein inerter, sehr schwer in Wasser löslicher innerer Standard eingesetzt werden. Dies setzte nämlich voraus, daß während der gesamten Versuchszeit ein Überschuß an Kohlenwasserstoff vorhanden wäre, damit sich der innere Standard möglichst vollständig in der lipophilen Phase befindet. Das Problem wurde stattdessen mit 2 anderen Methoden teilweise oder ganz bewältigt. Bei Versuchen in Fermentern wurden die beiden Flüssigphasen gleichmäßiger durchmischt als im Schikanenkolben; bei Experimenten mit dampfförmig zugeführten Kohlenwasserstoffen entfiel die hydrophobe Flüssigphase. - Um den zweiten kritischen Schritt kontrollieren zu können, müßten, den erwarteten Extraktkomponenten entsprechend, mehrere innere Standards verwandt werden, die jeweils annähernd dieselbe Flüchtigkeit haben. Wegen des hohen Aufwands erschien dieses Verfahren nicht praktikabel. Eine Alternative bot das in II.10. und III.1.2. vorgestellte Kartuschen-Extraktionsverfahren. Die quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten erfolgte, wie im folgenden Kapitel beschrieben, mit Hilfe der Gaschromatographie.

Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationsangaben für Kohlenwasserstoffe beziehen sich - soweit nicht ausdrücklich anders vermerkt - auf die eingesetzte Menge (in ml oder Mol) bezogen auf das Gesamtvolumen der Nährlösung (in ml). Im Normalfall ist daher nur ein minimaler Anteil tatsächlich g e l ö s t (siehe Tab.1, S.19).

1.1. Gaschromatographische Bestimmung von Tetralinoxidationsprodukten in Kulturextrakten

Bei den Experimenten zur Cooxidation von Tetralin (siehe III.4., S.70ff) wurden Kulturextrakte gewonnen, deren Komponenten mit Hilfe

der Gaschromatographie bestimmt werden sollten (siehe II.11., S.17). Es wurde angestrebt, sowohl das unpolare Tetralin als auch die polaren Oxidationsprodukte, Tetralol-1 und Tetralon-1 in einem Schritt zu bestimmen. Für diesen Zweck wurde anfangs eine Silikongummisäule verwendet. Pelz[75] verwendete ebenfalls Silikongummi als stationäre Phase bei der Identifizierung von Decalolen. Die gewünschte Auftrennung wurde mit dem in Tab.2 angegebenen Temperaturprogramm erreicht. Die Säule war jedoch für eine quantitative Bestimmung von Tetralol-1 und Tetralon-1 nicht geeignet, da die Peaks dieser Substanzen starkes "Tailing" zeigten (siehe Anhang, S.122).

Tab.2: Gaschromatographischer Nachweis von Tetralin, Tetralinoxidationsprodukten sowie anderen Kohlenwasserstoffen[a)]

Temperaturprogramm Nr.	Trennproblem	Programmdaten
1	Tetralin, Tetralol-1, Tetralon-1	80° (15 min), 4°/min →200°
2	Tetralol-1-Zersetzung	isotherm 140°
3	Tetralin, Tetralol-1, Tetralon-1, -2	140° (3 min), 60°/min→ 180°
4	Tetralin, Tetralol-1, Tetralon-1, -2	120° (3 min), 16°/min→ 160°
5	Naphthalin, Tetralin, Tetralol-1, Tetralon-1, -2	130° (3 min), 60°/min→ 180°
6	Octan, Octanol-1, Octanal	90° (0 min), 8°/min→ 130°
7	Tetralin, Octan, Octanol-1, Octanal	90° (0 min), 8°/min→ 180°

a) nähere Angaben über die verwendeten Geräte siehe II.11. (S.15); Beispiele für die Anwendung siehe Anhang (S.122ff)

Zudem traten in späteren Versuchen ungeklärte Zersetzungen des Tetralol-1 auf, die früher nicht beobachtet wurden (siehe Anhang, S.123). Eine Dehydratisierung des Tetralol-1 wäre denkbar[9]. Wesentlich bessere Ergebnisse wurden mit Carbowax 20 M als stationärer Phase erzielt (siehe Anhang, S.124). Die Retentionszeiten waren kürzer, die Peaks schärfer. Das in Tab.2 (S.23) angegebene Temperaturprogramm reichte aus, um auch Tetralon-1 und -2 zu trennen. Abb.37b(siehe Anhang, S.124) zeigt die Auftrennung weiterer, als Referenzsubstanzen zur Verfügung stehender Tetralol-Isomere. Tetralol-2 war nicht erhältlich. Die Auftrennung von Tetralol-1 und -2 gilt jedoch unter diesen Umständen als sicher.

Eine Reihe von Cooxidationsversuchen sollte in Gegenwart der Wachstumssubstrate (z.B. Octan oder Naphthalin) durchgeführt werden. Diese sollten, ebenso wie eventuell auftretende Intermediate (z.B. Octanol), neben Tetralin und dessen Produkten aufgetrennt werden. Das erforderte andere Temperaturprogramme, da sonst z.B. Tetralin und Octanol-1 nicht getrennt werden konnt·

Kohlenwasserstoffe können durch Luftsauerstoff autokatalytisch oxidiert werden[28]. Bei Cooxidationsversuchen kann die Autoxidation möglicherweise durch die hohe Sauerstoffeintragrate und die katalytische Wirkung der in der Nährsalzlösung enthaltenen Metallionen (z.B. Fe^{++}, Cu^{++}) begünstigt werden. Zudem zeigte sich in Vorversuchen, daß das zur Verfügung stehende 99%ige Tetralin geringe Anteile der erwarteten bakteriellen Oxidationsprodukte (jeweils 0,2%) enthielt. Diese konnten auch durch Destillation über Natrium und Natronlauge nicht entfernt werden. Nach dem Passieren einer Kieselgelsäule waren die geringen Spuren immer noch vorhanden.

In Kontrollversuchen mit einer Nährlösung o h n e Bakterienzellen wurde die Anreicherung von Tetralinoxidationsprodukten bei dampfförmiger Tetralinzufuhr untersucht. Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie bei Versuchen mit Bakterienzellen. Bei einer Strömungsrate von 26 mg Tetralin pro Stunde wurden nach 48 Stunden 0,74 mg Tetralon-1 und 0,84 mg Tetralol-1 pro l in der Nährlösung nachgewiesen (siehe Anhang, S.126).

1.2. Extraktion von Metaboliten mit Hilfe von Sep-Pak-C_{18}-Kartuschen

Die Bestimmung von Kohlenwasserstoffen und deren Metaboliten in Kulturflüssigkeiten erforderte eine Anreicherung der in den Proben enthaltenen Komponenten. Das Einengen der Kulturflüssigkeit oder deren Extrakte hatte sich als ungeeignet erwiesen (siehe S.22f). Um die Kinetik des Substratumsatzes zu untersuchen, wurde zudem ein Verfahren gesucht, mit dem eine Vielzahl von Proben schnell und reproduzierbar aufgearbeitet werden konnte. Für diesen Zweck boten sich die Sep-Pak-Kartuschen der Fa. Waters, Königstein, an. Bei diesen neu entwickelten Kartuschen wird das Prinzip der Adsorptionschromatographie im kleinen Maßstab angewendet. Für die Aufarbeitung von wäßrigen Proben (z.B. Kulturüberständen) eignen sich vor allem die silanisierten C_{18}-Kartuschen. Von der "Umkehrphase" werden die Substanzen mit hoher Polarität durch Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril zuerst eluiert. Erst kürzlich wurden die ersten Anwendungsbeispiele veröffentlicht [25,84].

Für die Bestimmung von Tetralin und dessen Oxidationsprodukten wurden Proben des Kulturüberstands, wie in II.10. (S.16) beschrieben, mit Kartuschen aufgearbeitet. Die Extrakte wurden gaschromatographisch analysiert (siehe III.1.1., S.22). Auf diese Weise konnte in sehr kurzer Zeit die erwünschte Anreicherung erzielt werden: Das Beladen der Kartuschen dauerte maximal 1,5 Minuten, das Eluieren 5 bis 15 Sekunden; das herkömmliche Extraktionsverfahren mit anschließendem Einengen im Rotationsverdampfer hätte 15 bis 25 Minuten erfordert.

Im folgenden Kapitel wird beschrieben, wie effektiv die Adsorption und Elution von Tetralin und anderen Kohlenwasserstoffen ist.

1.3. Bestimmung von Tetralin und anderen Kohlenwasserstoffen im Luftstrom

Ein wichtiges Kriterium für die Untersuchung der bakteriellen Verwertung von Tetralin ist die Bestimmung der Substratabnahme. Für die Bilanzierung des Umsatzes von Tetralin in Oxidationsprodukte ist

die Substratabnahmebestimmung ebenfalls unerläßlich. Wie aus der Literatur bekannt und in eigenen Versuchen bestätigt (siehe III.3.1.2. S.49f), können manche Kohlenwasserstoffe verwertende Bakterien nur wachsen, wenn das Substrat als Dampf in die Kultur eingetragen wird [33,100]. Eine Möglichkeit, das Substrat in der Dampf- und in der Flüssigphase zu bestimmen war nicht bekannt - von aufwendigen großtechnischen Kohlenwasserstoffdetektoren abgesehen[46]. Deshalb wurde untersucht, ob mit den im vorigen Kapitel beschriebenen Kartuschen auch dampfförmige Kohlenwasserstoffe adsorbiert und anschließend quantitativ bestimmt werden konnten. Vom Hersteller der Kartuschen war dieser Anwendungsbereich nicht vorgesehen.

Naphthalin- oder Tetralindampf konnte, wie in II.8., (S.15) beschrieben, mit C_{18}-Kartuschen adsorbiert werden. Nach dem Eluieren wurden die Kohlenwasserstoffe photometrisch (siehe Tab.3, S.27) oder gaschromatographisch quantitativ bestimmt (siehe II.11., S.17). Zunächst wurde ein geeignetes Eluenz gesucht. Vorversuche hatten gezeigt, daß Tetralin n a c h Naphthalin eluiert wurde. Deshalb wurde ein Lösungsmittel gesucht, daß T e t r a l i n vollständig eluiert. Dabei zeigte sich, daß Chloroform die effektivsten eluierte - abgesehen von Hexan und Heptan, die zusätzlich noch Teile der stationären Phase eluieren. Methanol eluierte weniger als die Hälfte des adsorbierten Tetralins. Für eine 99%ige Elution waren etwa 9 ml Chloroform erforderlich. Doch schon mit 3 ml wurden 82,8 bis 85,3% (photometrisch) bzw. 82,7 bis 83,7 (gaschromatographisch) ermittelt (siehe Abb.9, S.28). Vergleichbare Angaben machten andere Autoren, die - gemäß dem ursprünglichen Verwendungszweck - in wäßrigen Medien Benzidin, Dichlorbenzidin, Diphenylhydrazin oder Warfarin bestimmten[25,84].

Die Vollständigkeit der Adsorption und Elution von Tetralin wurde folgendermaßen überprüft: Zwei Kartuschen wurden hintereinander in den Tetralindampfstrom eingebracht. Nach dem Eluieren wurde nur im Eluat der ersten Kartusche eine Adsorption gemessen; im Eluat der hinteren Kartusche wurde kein Tetralin gefunden. Außerdem wurde die Tetralinabnahme in der Tetralinwaschflasche (s.Abb.6b, S.13) gravimetrisch bestimmt. Beim Eluieren mit 5 ml Chloroform bzw. 5 ml Hexan wurde durch die p h o t o metrische Bestimmung 89% bzw. 104% des gravimetrisch bestimmten Tetralins nachgewiesen. Weil Hexan Teile der stationären Phase eluierte, wurde Chloroform als Eluenz vorgezogen.

Tab.3: Photometrische Bestimmung von Kohlenwasserstoffen in Kartuschen-Eluaten[1)]

Kohlenwasserstoff standardauflösung in Chloroform	Konzentration der Standardauflösung c [mg/ml]	Absorptions-Maximum λ [nm]	Absorption der Standardauflösung A	Molarer Extinktionskoeffizient log ε		Absorptions-Äquivalent [mg/ml] (≙ A=1)
				gemessen	Literaturwert[113]	
Naphthalin	20,00	274	925	3,77	3,76	$2{,}1622 \times 10^{-2}$
Tetralin	19,32	274	82	2,75	2,90	0,2357
	28,99	265	124	2,85	2,84	0,2376

Absorption des Eluats × Absorptionsäquivalent × Eluatvolumen = Kohlenwasserstoff im Eluat
[mg/ml] [ml] [mg]

[1)] Die mit Kartuschen adsorbierten und anschließend eluierten Kohlenwasserstoffe (siehe II.8., S.15) wurden aus der angegebenen Formel errechnet. Das Absorptionsäquivalent ergab sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz. Beim Eluatvolumen wurde berücksichtigt, daß eine zuvor nicht benetzte Kartusche nach der Elution 0,4 ml des eingesetzten Eluenz zurückhält.

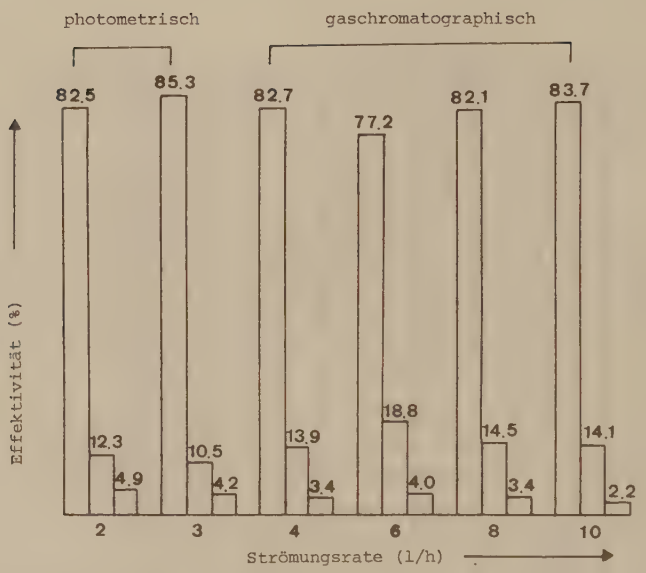


Abb.9: Effektivität der Elution von Tetralin durch Chloroform in 3 Schritten

Kartuschen wurden, wie in II.8. (S.15) beschrieben, bei verschiedenen Strömungsraten mit Tetralindampf beladen und mehrfach mit je 3 ml Chloroform eluiert. Im vierten Eluat war die Kohlenwasserstoffkonzentration unmeßbar klein; die Summe der in 3 Schritten eluierten Tetralinmenge wurde deshalb gleich 100% gesetzt. Die Tetralinbestimmung erfolgte gemäß den Angaben zu Abb.10. Die eluierte Kohlenwasserstoffmenge war zur jeweiligen Strömungsrate direkt proportional (s.Abb.10).

Aus Abb.10 (S.30) geht hervor, daß die gaschromatographisch oder photometrisch bestimmte Kohlenwasserstoffmenge direkt proportional zur jeweils variierten Störmungsrate oder Strömungs- bzw. Meßdauer ist. Bei gleicher Luftströmungsrate ist infolge der unterschiedlichen Dampfdrucke etwa 3 mal soviel Tetralin wie Naphthalin im Strömungssystem enthalten (s.Abb.11, S.31). Kontrollversuche mit fabrikneuen, unbeladenen Kartuschen ergaben anfangs relativ hohe Grundabsorptionen (z.B. $A_{274} = 0{,}43$ bei 3 ml Eluat). Durch Spülen der Kartuschen mit 9 ml Chloroform konnte die Absorption auf $A_{274} = 0{,}01 \pm 0{,}01$ gesenkt werden. Vor der Messung von Kohlenwasserstoffen wurden daher alle Kartuschen mit 9 ml Chloroform gespült und 5 Minuten im Luftstrom (3 l/min) getrocknet. Diese fabrikationstechnisch bedingten

Verunreinigungen der Kartuschen wurden bei neueren Lieferungen - von der Fabrikationsnummer 932313 an - nicht mehr festgestellt.

Wegen des geringen experimentellen Aufwands und der Schnelligkeit erfolgte die Bestimmung der Kohlenwasserstoffanalyse vornehmlich im Spektralphotometer. Hier konnten vor allem Arene wie Naphthalin und Tetralin mit ihren Absorptionsmaxima zwischen 220 und 320 nm sehr gut bestimmt werden. Alkane, z.B. Hexadecan ließen sich auf diese Weise nur im Bereich der Endabsorption ($\lambda < 210$ nm) bestimmen. Die Nachweisempfindlichkeit war jedoch geringer und die Störanfälligkeit gegenüber anderen Verbindungen größer.

1.4. Zusammenfassung der analytischen Verfahren zum Nachweis von Kohlenwasserstoffen und deren Oxidationsprodukten

1. Durch gaschromatographische Analyse wurde Tetralin, Tetralon-1, Tetralon-2 und Tetralol-1 in Testlösungen aufgetrennt. Die Bedingungen für den Nachweis von Tetralin und dessen erwarteten Oxidationsprodukten i n G e g e n w a r t anderer Kohlenwasserstoffe und deren Intermediate wurden ermittelt.
2. In der Dampfphase enthaltenes Naphthalin und Tetralin wurde mit Sep-Pak-C_{18}-Kartuschen adsorbiert und nach Extraktion quantitativ bestimmt.
3. Die Isolierung von Inhaltsstoffen aus Kulturüberständen erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Sep-Pak-C_{18}-Kartuschen.
4. Die Anreicherung von Tetralol-1 und Tetralon-1 während der Einleitung von dampfförmigem Tetralin in eine Nährlösung o h n e Bakterien wurde in Kontrollversuchen bestimmt.

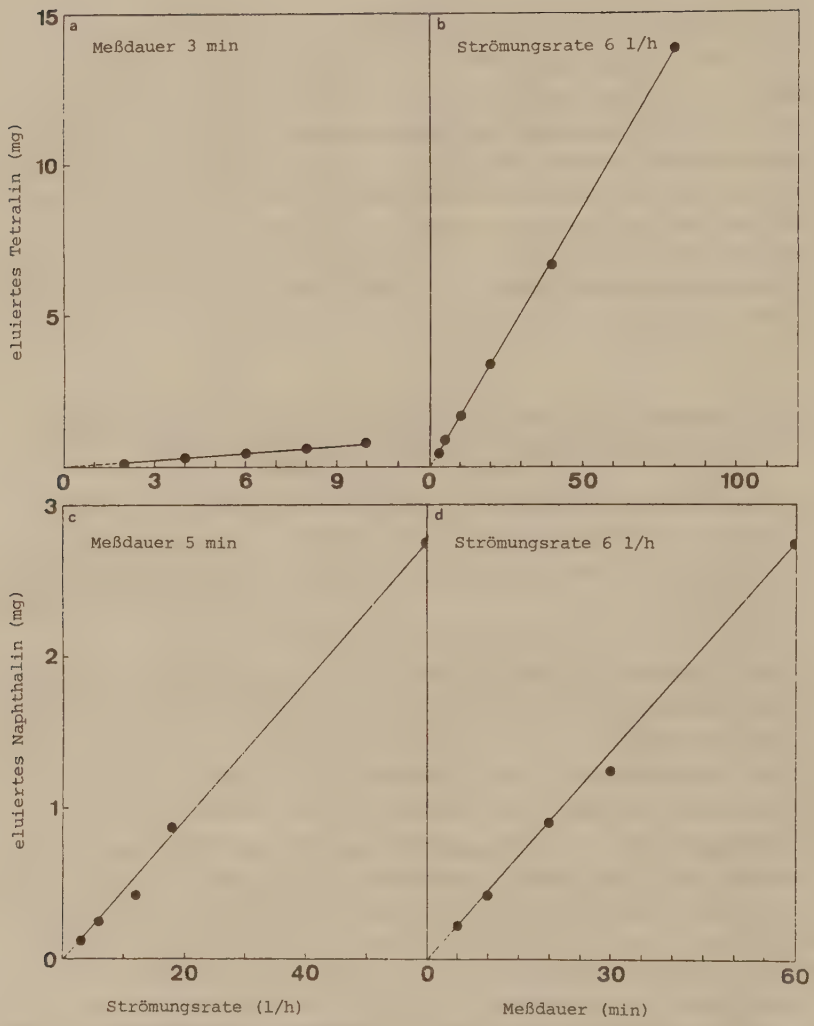


Abb.10: Quantitative Bestimmung von Kohlenwasserstoffen im Dampf-Luft-Strömungssystem

Tetralin (a und b) und Naphthalin (c und d) wurden bei konstanter Meßdauer und variierter Strömungsrate bzw. bei konstanter Strömungsrate und variierter Meßdauer bestimmt. Die Menge der adsorbierten Kohlenwasserstoffe wurde gaschromatographisch oder photometrisch bestimmt (siehe II.8. u.11., S.15 u.17 sowie Tab.3; S.27)

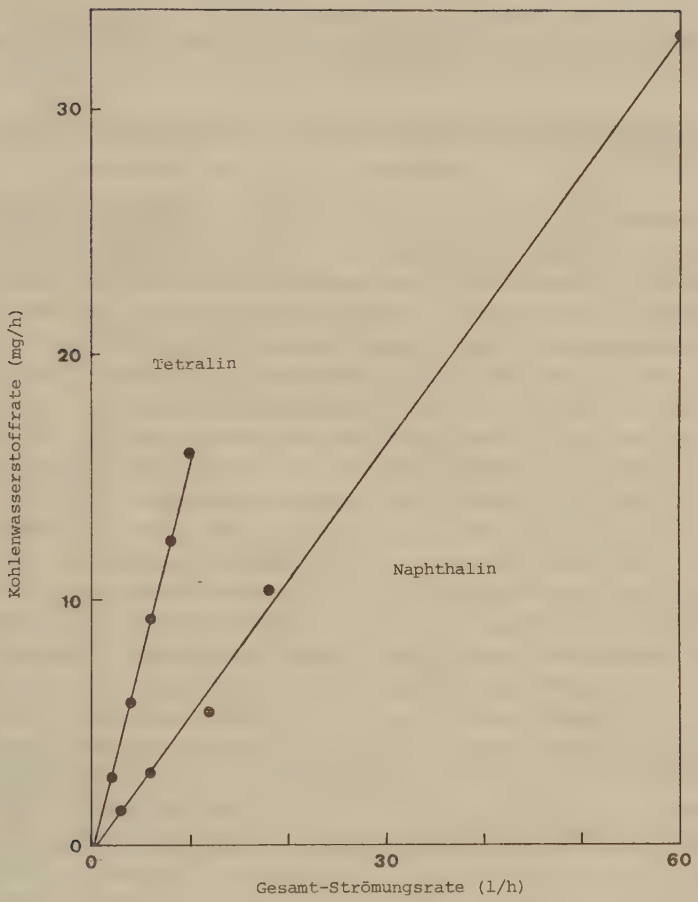


Abb.11: Kohlenwasserstoff-Strömungsraten in Abhängigkeit von der Gesamtströmungsrate

Die quantitative Bestimmung erfolgte, wie in der Legende zu Abb.10 beschrieben

2. Isolierung und Charakterisierung von Kohlenwasserstoffe verwertenden Bakterienstämmen

2.1. Versuche zur Isolierung von Tetralin verwertenden Bakterienstämmen

In Vorversuchen sollten für die Isolierung von Tetralinverwertern geeignete Bedingungen erprobt werden. Ein für möglichst viele Bakterienstämme verwendbares Nährsalzmedium sowie die Beeinflussung des Bakterienwachstums durch Tetralin wurde getestet. Sechzehn Laborstämme, die in Tab.4 aufgeführt sind, wurden untersucht. Dabei zeigte sich auf Minimalagar NS1 mit 2 mM Succinat als Kohlenstoffquelle schon nach 24 Stunden gutes Wachstum. Die Bakterienstämme wuchsen auch, wenn anstelle von Succinat der dem jeweiligen Phänotyp (s. Tab.4) entsprechende Kohlenwasserstoff eingesetzt wurde. Das Nährmedium NS1 sollte daher für die Bakterienisolierung geeignet sein. Wurden die erwähnten Stämme auf Minimalagar ohne Kohlenstoffquelle ausgestrichen und in Tetralin haltiger Atmosphäre bebrütet, zeigte sich erst nach 5 bis 15 Tagen bei einigen Stämmen schwacher Wuchs. Dieser war aber nicht auf die Verwertung von Tetralin zurückzuführen, da diese Stämme auch auf Kontrollplatten ohne Kohlenstoffquelle wuchsen. Dieses Phänomen beobachteten auch andere Autoren; es könnte durch nicht identifizierte organische Luftverunreinigungen oder durch CO_2-Fixierung erklärt werden [76,77,89]. Deshalb wurden im folgenden sämtliche Isolate auch auf Kontrollplatten ohne Kohlenstoffquelle untersucht; diese Platten wurden in einem Raum bebrütet, in dem nicht mit Kohlenwasserstoffen gearbeitet wurde. Eine Hemmung des Bakterienwachstums durch Tetralin konnte in weiteren Vorversuchen nicht festgestellt werden: (1) Das Wachstum von 5 getesteten Stämmen (Nr. 1 bis 5, Tab.4) auf Minimalagar mit 2 mM Succinat wurde in Gegenwart von dampfförmigem Tetralin nicht gehemmt; die Kolonien waren auf den Kontrollplatten genauso groß. (2) Auch in Gegenwart von flüssigem Tetralin wurde Bakterienwachstum nachgewiesen: Aus zwei verschiedenen Bodenproben wurden Bakterien isoliert, die in einer Flüssigkultur (siehe II,7.2., S.14) drei Tage lang in Gegenwart von Tetralin (0,05% $\hat{=}$ 3,7 mM) inkubiert worden waren. Allerdings wuchsen die daraus isolierten Bakterien auch wieder mit und ohne Tetralin: Von der

Platte abgeimpfte Zellen wuchsen in der Flüssigkultur mit und ohne Tetralin von anfangs 5×10^5 Zellen/ml innerhalb von drei Tagen bis zu einer Endkonzentration von 5×10^7 Zellen/ml.

Tab.4: Bakterienstämme für die Erprobung geeigneter Verfahren zur Isolierung von Tetralinverwertern

Lfd.Nr.	Stamm [a]	Phänotyp [b]
1	Pseudomonas aeruginosa	Xyl^+
2	Pseudomonas aeruginosa	Tol^+
3	Pseudomonas aeruginosa	$Dodecan^+$, $Hexadecan^+$
4	Pseudomonas putida	Sal^+
5	Pseudomonas putida	Trp^-, Oct^+
6	Escherichia coli K12	WT
7	Stamm WR 5	$Benz^+$, $Anth^+$
8	Stamm WR 6	Nah^+
9	Stamm WR 7	$Benz^+$, Tol^+
10	Stamm Wr 8	$Benz^+$, Tol^+
11	Stamm WR10	$Benz^+$, $Anth^+$
12	Stamm WR12	Nah^+, $Benz^+$, Tol^+
13	Stamm WR28	Nah^+, $Benz^+$, Tol^+
14	Stamm WR29	$Benz^+$, Tol^+
15	Stamm WR30	$Benz^+$, Tol^+
16	Stamm WR31	$Benz^+$, Tol^+

[a] Herkunft der Stämme, siehe S.8

[b] Anth = Anthranilat; Benz = Benzol; Nah = Naphthalin; Oct = Octan; Sal = Salicylat; Tol = Toluol; Trp = Tryptophan; WT = Wildtyp; Xyl = Xylol

Die Versuchstechniken zur Isolierung von Tetralin verwertenden Bakterien sind in Abb.12 schematisch dargestellt. Tab.5 gibt Aufschluß über die Herkunft der 32 untersuchten Boden- und Wasserproben. Sie stammen fast ausschließlich von Biotopen, in denen bereits eine Vorselektionierung für Kohlenwasserstoffe verwertende Bakterien zu erwarten war. Deshalb wurden feste Proben in Puffer suspendiert, flüssige mit Puffer verdünnt und auf Minimalagar mit Tetralin als Kohlenstoffquelle ausplattiert (siehe II.3.1., S.10). Auf diese Weise wurde kein Tetralinverwerter gefunden.

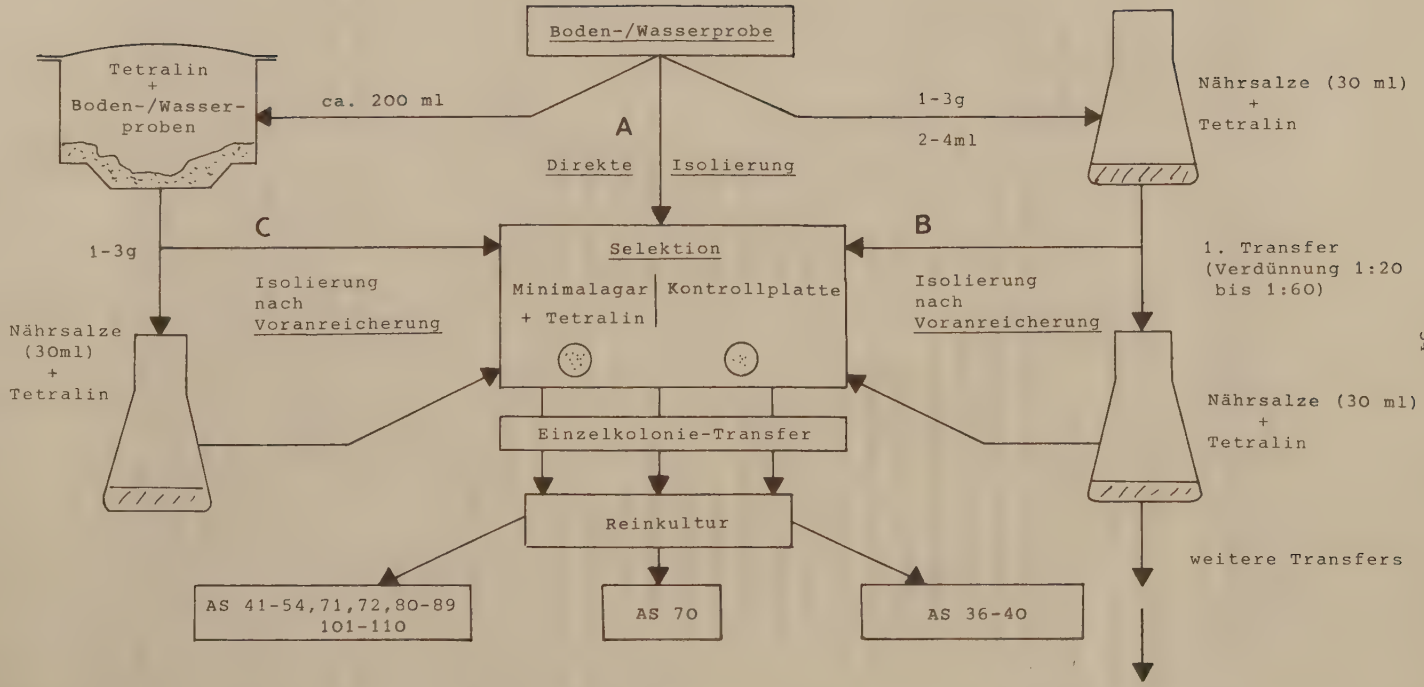


Abb.12: Isolierung von Bakterien aus Boden- und Wasserproben mit Tetralin als selektiver Kohlenstoffquelle

Tetralinverwerter wurden nicht durch A, B, C gefunden (s. II.31, S. 12). Andere Kohlenwasserstoffverwerter wurden, wie in III.2.2 (S. 31) beschrieben, isoliert.

Tab.5: Art und Herkunft der Proben für die Isolierung von Kohlenwasserstoffe verwertenden Bakterien

Lfd. Nr.	Art und Herkunft
1	Gartenerde Bochum
2	Gartenerde Bochum
3	Erde von einer Wiese Bochum
4	Wasser vom Ölbach, enthält städt. Abwasser Bochum
5	Erde aus Laubwald Bochum
6	Erde aus Nadelwald Göttingen
7	Öl und Abwassergemisch von einer Tankstelle Göttingen
8	Erde aus einem Gewächshaus des Botanischen Gartens Bochum
9	Schlamm von einer bewachsenen Kohlenhalde Herten
10	Gemisch aus Erde und Kohle einer Halde (s.Nr.9)
11	Gemisch aus Lehm, Kohle und schwelendem Holz (s.Nr.9)
12	Schlamm- und Wassergemisch mit Kohleuntergrund (s.Nr.9)
13	Flugsand und Koks in der Nähe der Batterie der Kokerei Gelsenkirchen-Hassel
14	Schlamm in der Nähe der Batterie der Kokerei Gelsenkirchen-Hassel
15	Erde vom Rasen in der Nähe der Batterie der Kokerei Gelsenkirchen-Hassel
16	Erde der Vorkühlung der Kokerei Gelsenkirchen-Hassel
17	Erde und Schlamm vom Rand einer Kokshalde der Kokerei Gelsenkirchen-Hassel
18	Feuchte Erde von Löschturmumgebung und Teerablaßstelle der Kokerei Gelsenkirchen Hassel
19	Wasser vom Löschwasserabfluß der Kokerei Gelsenkirchen-Hassel
20	Wasser vom Kühlwassersammelbecken der Kokerei Gelsenkirchen-Hassel
21	Wasser aus der Ruhr in Duisburg-Ruhrort
22	Wasser aus der Ruhr bei der Meidericher Schiffswerft, "Ölinsel", Duisburg-Meiderich
23	Wasser aus der Ruhr, "Ölverladung", Duisburg-Meiderich
24	Wasser aus der Weser bei Bremerhaven
25	Wasser aus der Trave bei Lübeck
26	Wasser aus dem Main bei Wertheim
27	Wasser aus dem Main bei Frankfurt-Höchst
28	Kuhmist Ernsthofen
29	Jauche Ernsthofen
30	Altöl und Schmutzwasser einer Tankstelle Bochum
31	Verdorbenes Speiseeis Essen
32	Altes Zentrifugenöl Bochum

Neben den Versuchen, Tetralinverwerter direkt zu isolieren, wurden Anreicherungskulturen von den Proben 1 bis 32 (Tab.5) angesetzt (s.II.3.2, S.10). Eine Übersicht über die verschiedenen Versuchsreihen, die in Flüssigkulturen durchgeführt wurden, ist in Tab.6 wiedergegeben. Das Verhalten der Mischpopulationen wurde durch mikroskopische Beobachtung, durch Keimzahlbestimmung auf NB-Platten und durch Wachstumstests in flüssigen Minimalmedien bzw. auf Minimalagar kontrolliert. Durch mehrmaliges Überimpfen in frisches Medium mit Tetralin als einziger Kohlenstoffquelle sollten nicht wachsende Bakterien ausverdünnt und Tetralinverwerter angereichert werden. Gleichzeitig wurden dabei von der Mischpopulation gebildete, die Selektionierung ggf. störende Metabolite eliminiert.

Um auch potentielle Tetralinverwerter mit sehr langer lag-Phase oder langer Generationszeit nicht zu übersehen, wurden die Kulturen in allen Anreicherungsstufen teilweise bis zu 6 Wochen aufrecht erhalten. Diese Versuchsdauer zwang dazu, der Verflüchtigung von Wasser und Tetralin besondere Beachtung zu schenken. Mit Aluminiumfolie oder Silikongummistopfen verschlossene Kolben eigneten sich nicht, da erstere vor allem Wasserdampf, letztere mehr Tetralin durchließen. Eine Tetralinkonzentration von 3 mM wurde schon in 1,5 Versuchstagen bei 30°C völlig verflüchtigt. Deshalb wurden die Anreicherungsversuche in Erlenmeyerkolben durchgeführt, die mit PTFE-abgedichteten Schraubkappen verschlossen wurden. Bei einem Flüssigkeitsvolumen von maximal 10% des Kolbenvolumens war eine ausreichende Sauerstoffmenge gewährleistet.
Es gelang weder durch Variation der Tetralinkonzentration im Bereich von 3,7 bis 74 mM (≙ 0,05 bis 1% v/v) noch durch Verwendung von 4 verschiedenen Nährmedien einen Bakterienstamm zu isolieren, der in Reinkultur mit Tetralin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wuchs (siehe Tab.6, S.37). Häufig wurden jedoch von Tetralinplatten und Kontrollplatten dieselben Kolonietypen isoliert. Eine Tetralinverwertung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

In weiteren Versuchen sollten natürliche Selektionsbedingungen imitiert werden. Wie in II.3.3., S.11 beschrieben, wurden in einem ersten Versuch die Proben Nr.9 und 10 und in einem zweiten die Proben Nr.11 bis 23 (Tab.5, S.35) in Exsiccatoren mit Tetralin als selek-

tiver Kohlenstoffquelle inkubiert. Zu einem Erd- und Schlammvolumen von ca. 200 ml wurden jeweils 68 µl Tetralin und in Versuch 2 zusätzlich 53 µl Cyclohexan, 50 µl cis- und 50 µl trans-Decalin sowie je 50 µl Adipat und Salicylat (1 M Natriumsalze) gegeben. Obwohl besonders bei Versuch 2 starker Sauerstoffverbrauch beobachtet wurde und der Tetralingeruch abnahm, wurde mit den in II.3.1. und 2., S.10f beschriebenen Methoden kein Tetralin, Cyclohexan oder Decalin verwertendes Bakterium gefunden. Nach 5 Wochen wurde aus Versuchsansatz 2 lediglich ein Coumarin- und ein Octanverwerter (Stamm AS 71 und 72) isoliert. Aus Versuchsansatz 1 wurden mehrere Naphthalin- und Hexadecanverwerter isoliert (siehe folgendes Kapitel). Versuch 1 wurde nach 5 Monaten, Versuch 2 nach 12 Monaten abgebrochen.

Tab.6: Versuchsreihen zur Anreicherung von Tetralin verwertenden Bakterienstämmen[a] in Flüssigkulturen

Anreicherungs-medium[b]	Tetralin-konzentration [% v/v]	getestete Proben[c]
NS1 NS2 NS3 NS4	0,05	1 - 8
NS1	0,05 0,1 0,2 0,5 1,0	4,7,9,10
NS1	0,05	9 - 32

[a] Bakterien, die Tetralin als alleinige C- und Energiequelle verwerten, wurden nicht isoliert; andere Kohlenwasserstoffverwerter wurden jedoch angereichert (s. Text und Legende zu Abb.12,S.34)

[b] siehe II.2. (S.8) und II.3.2. (S.10)

[c] siehe Tab.5 (S.35)

2.2. Isolierung von Bakterienstämmen, die aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe verwerten

Alle Versuche, Bakterien zu isolieren, die Tetralin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten können, waren erfolglos geblieben. Für die Untersuchung der Abbaubarkeit von Tetralin sollten nun Alkan-, Aren- und Campherverwerter herangezogen werden, die für die Cooxidation von Tetralin geeignet erschienen (siehe S.6f und Abb.5).

Nach 3 Anreicherungsschritten in Flüssigkulturen mit Tetralin als selektiver Kohlenstoffquelle wurden die Stämme AS 36 bis 40 isoliert (siehe Abb.12, S.34); Stamm AS 36, 37 und 40 stammten von einer Kohlenhalde, Stamm AS 38 und 39 vom Abwasser enthaltenden Ölbach (Probe Nr.10 bzw. 4 in Tab.5, S.35).

Die Proben Nr.9 und 10 (s.Tab.5) wurden im Exsiccator mit Tetralin als selektivem Substrat inkubiert (siehe II.3.3., S.11 und S.36). Nach 3 Wochen wurden daraus die Stämme AS 41 bis 54 und nach 9 Wochen die Stämme AS 80 bis 89 als Reinkultur isoliert. Von den isolierten Stämmen wuchsen 21 mit Naphthalin oder Hexadecan; 14 konnten sowohl mit Naphthalin als auch mit Hexadecan als alleiniger Kohlenstoffquelle angezogen werden.

Nach 5-wöchiger Exsiccator-Voranreicherung mit Tetralin, Decalin, Cyclohexan, Adipat und Salicylat (siehe Versuch 2, S.37) wurden 2 Bakterienstämme isoliert, die Coumarin[a)] (Stamm AS 71) und Octan (Stamm AS 72) verwerten können. Die Bakterienstämme AS 101 bis 110 wurden nach 6 Monaten aus derselben Anreicherungskultur isoliert.

Die bisher genannten Stämme wurden alle in Gegenwart von Tetralin aus Anreicherungskulturen isoliert. Folglich sind sie nicht nur tolerant gegen Tetralin, sondern sie können vermutlich auch in Gegenwart von Tetralin wachsen. Deshalb erscheinen sie für die Untersuchung der Cooxidation von Tetralin besonders geeignet.

Ein Campher-Verwerter wurde im direkten Plattenverfahren (siehe II.3.1., S.10) aus Wasser der Weser (Probe Nr.24 in Tab.5, S.35) isoliert.

[a)] Coumarin tritt beim Abbau von Naphthalin durch Pseudomonaden auf, und ein strukturverwandtes Intermediat kann für den Tetralin-Abbau postuliert werden (siehe Abb.3, S.4).

2.3. Charakterisierung der neu isolierten Bakterienstämme

Die neu isolierten Bakterienstämme waren alle gram-negativ, mesophil [a)] und zeigten positive Oxidase-Reaktion. Daher bot sich das von der Fa. Hoffmann-La Roche entwickelte "Oxi-Ferm"-Verfahren zur Identifizierung von Bakterien an. Zur weiteren Charakterisierung wurden Substratverwertungsspektren erarbeitet. Anhand dieser sollten die für Cooxidationsversuche infrage kommenden Stämme ausgewählt und evtl. auftretende Abbauprodukte vorhergesagt werden.

2.3.1. Taxonomische Bestimmung

Das "Oxi-Ferm"-System wurde speziell entwickelt für die Identifizierung von oxidativ-fermentativen, aeroben, gramnegativen Stäbchen. Es besteht aus 10 biochemischen Hauptreaktionen, die zu einer Schlüsselzahl für das Computer-Codier-System führen. Unter dieser Schlüsselzahl sind meist 2 bis 4 Bakterienarten (u.U. verschiedener Gattung) aufgeführt. Deshalb müssen zur weiteren Charakterisierung Zusatztests durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der Tests mit den Bakterienstämmen, die für die Untersuchung des Tetralinabbaus verwendet wurden, sind in Tab.7,S.40, zusammengefaßt. Die Gewißheit einer richtigen taxonomischen Einordnung wurde durch einige widersprüchliche Reaktionen eingeschränkt. Bei den Stämmen AS 39, AS 70, AS 71 und AS 72 wurde anfangs keine Stickstoffbildung registriert. Das führte zu einer falschen Bestimmung. Nach mehreren Wiederholungen des Tests trat dann teils schwache, teils stärkere Stickstoffbildung auf. Diese Schwankungen sind vermutlich von der jeweiligen Größe des Inoculums abhängig. Vor allem, wenn das Impfmaterial zur Agglomeration, wie Stamm AS 72, oder zu rascher Autolyse neigt, sind hier Fehlbeurteilungen möglich. Zur Absicherung der taxonomischen Bestimmung wären die Methoden von Stanier et al. [99] und Palleroni et al. [73] geeignet. Für die vorliegende Untersuchung erschien jedoch die Erstellung ausführlicher Substratverwertungsspektren wichtiger. Diese sollten dazu dienen, die verschiedenen Stämme von einander zu unterscheiden, ihre katabolischen Fähigkeiten zu erfassen und Tetralin-Cooxidationsprodukte vorherzusagen.

a) Da in der Biotechnologie besonderes Interesse an thermophilen Bakterien besteht, wurden die bei 42°C wachsenden Bakterien zusätzlich bei 50°C inkubiert.

Tab.7: Identifizierung[a)] von Bakterienstämmen unter Verwendung des Computer-Codier- und Identifikationssystems "Oxi-Ferm"

Bakterienstämme		AS39	AS47	AS70	AS71	AS72
VORREAKTION	Oxidasereaktion	+	+	+	+	+
	Gram-Färbung	-	-	-	-	-
HAUPTREAKTIONEN	Anaerobe Dextrosespaltung	+	-	-	-	-
	Arginindihydrolase	-	+	-	-	-
	N_2-Gasbildung	+	-	+	+	+
	H_2S-Bildung	-	-	-	-	-
	Indolreaktion	-	-	-	-	-
	Xyloseabbau	+	+	+	-	-
	Aerober Dextroseabbau	+	+	+	-	-
	Harnstoff/NH_3-Reaktion	-	+	-	-	-
	Citrat-/NH_4^+-Verwertung	+	+	+	-	+
ZUSATZREAKTIONEN	Gelatinase	-	+	-	-	+
	Wachstum bei 42°C	-	+	-	-	+
	Pyocyanin/-rubin Pigment	-	+	-	-	+
	Beweglichkeit	+	+	+	+	+
	Ampicillin-Sensibilität	+	-	-	-	+
	Kanamycin-Sensibilität	+	+	+	+	+
	Polymyxin B-Sensibilität	+	+	+	+	+
	Alkalische Dextrose-Reaktion	+	+	+	-	-
	Alkalische Xylose-Reaktion	+	+	+	+	-
	schnelle Harnstoffreaktion	-	+	-	-	-
Bakterienart		P.stutzeri	P.aeruginosa	P.stutzeri	A.faecalis	A.faecalis

a) Die Identifizierung erfolgte über Schlüsselzahlen, die sich aus den Hauptreaktionen ergeben. In Fällen, wo einer Schlüsselzahl mehrere Artnamen zugeordnet waren, erfolgte die Unterscheidung mit Hilfe der Zusatzreaktionen.

2.3.2. Substratverwertungsspektren

Die in Gegenwart von Tetralin oder anderen Kohlenwasserstoffen isolierten und die 4 von A.M. Chakrabarty zur Verfügung gestellten Bakterienstämme wurden mit 38 verschiedenen Substraten getestet (siehe Tab.8, S.42). Als Testsubstanzen wurden universelle Kohlenstoffquellen, zur taxonomischen Einordnung der Bakterienstämme geeignete Substrate und solche Verbindungen ausgewählt, die für die Durchführung von Cooxidationsversuchen geeignet erscheinen, bzw. Aufschluß über die katabolischen Eigenschaften der Stämme geben.

Die Tests wurden auf Agarplatten mit Mineralsalzmedium durchgeführt. Wasserlösliche Substrate (5 mM) waren im Agar enthalten; wasserunlösliche Substanzen wurden in den Deckel der Petrischalen gegeben (siehe II.7.1., S.14). Die Kontrollplatten enthielten nur Agar und Mineralsalzmedium. Nach dem Beimpfen wurden die Agarplatten bei 30°C bebrütet. Mit Ausnahme der überhaupt nicht gewachsenen wurden alle Stämme spätestens nach 11 Tagen auf frische Substratplatten überimpft, um eine Verfälschung durch Hinüberschleppen von Nährstoffen aus der Vorkultur auszuschließen. Die auf diesen Platten gewachsenen Stämme wurden nach weiteren 11 Tagen Bebrütung nochmals überimpft. Die in Tab.8 zusammengefaßte Endauswertung erfolgte nach insgesamt 2 Transfers, d.h. 33 Versuchstagen. Viele Stämme wuchsen bereits auf der Kontrollplatte. Bei der Entscheidung, ob Wachstum auf einer definierten Kohlenstoffquelle vorgelegen hatte oder nicht, wurde das Wachstum mit und ohne Testsubstrat verglichen.

Hinsichtlich des Substratspektrums sind folgende Stämme jeweils identisch:

AS 14, AS 40 und AS 52
AS 36 und AS 46
AS 80 und AS 86
AS 84 und AS 89

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Versuchen konnte kein Wachstum mit Decalin oder Tetralin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle nachgewiesen werden. Die potentiellen Abbauprodukte von Tetralin, Tetralol-1 und Tetralon-1, hemmten das Wachstum der unter-

Tab.8: Substratverwertungsspektren der neu isolierten Bakterienstämme

| a) | b) | c) | | d) | | | | | | | | | | | | | | | | | e) | | | | | | | | | | | | | | | | |

suchten Stämme, da auf den Kontrollplatten ohne Kohlenstoffquelle Wachstum stattfand. Der Stamm Nr.106 zeigte auf Agarplatten deutliches Wachstum in Gegenwart der Methyl- und Isopropylderivate des Tetralins. In der Flüssigkultur konnte dies jedoch nicht nachvollzogen werden.

In Flüssigkulturen von P.aeruginosa AS 47 wurden weitere 8 strukturell mit Naphthalin oder Tetralin verwandte Kohlenwasserstoffe auf ihre Verwertbarkeit getestet: Anthracen, Octahydroanthracen, Phenanthren, Octahydrophenantren, 9,10-Benzophenanthren, Dodecahydrophenanthren, 2-Isopropylnaphthalin und Isopropyltetralin. Dazu wurden erstens mit Hexadecan und zweitens mit Naphthalin angezogene Zellen 20 Tage mit den einzelnen Substraten (10 mM) in Nährlösung NS1 getestet. Es wurde kein Bakterienwachstum festgestellt.

2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Isolierung und Charakterisierung von Kohlenwasserstoffverwertern

1. In Isolierungs- und Anreicherungsversuchen mit Tetralin und anderen Kohlenwasserstoffen als selektiven Substraten wurden 40 Bakterienstämme isoliert. Keiner von diesen wuchs mit Tetralin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle. Von 15 Kohlenwasserstoffverwertern aus Stammsammlungen und anderen Laborstämmen konnte ebenfalls keiner Tetralin verwerten. Außerdem gelang es nicht, Cyclohexan- oder Decalinverwerter zu isolieren.
2. Für die Untersuchung des bakteriellen Abbaus von Tetralin wurden daher andere Alkan- und Arenverwerter isoliert.
3. Aufgrund ihrer Substratverwertungsspektren erschienen einige Bakterienstämme für Cooxidationsversuche geeignet; diese wurden vorläufig taxonomisch bestimmt als P.stutzeri AS 39 (Naphthalin), P.aeruginosa AS 47 (Octan, Hexadecan, Naphthalin), P.stutzeri AS 70 (Campher) und A.faecalis AS 72 (Octan).

3. Aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe als Substrate für das Wachstum von Bakterien

Für die Untersuchung des bakteriellen Abbaus von Tetralin standen keine Bakterien zur Verfügung, die diese Verbindung als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Eine partielle Verwertung durch Alkan- oder Arenverwerter war dennoch zu vermuten, wie viele Beispiele für die Cooxidation von Cycloalkanen durch n-Alkane verwertende Bakterien oder auch von Aren-Derivaten durch Arene verwertende Bakterien zeigen[34,71,112].

Das Auftreten von Cooxidationsprodukten hängt entscheidend von den jeweils vorliegenden Versuchsbedingungen ab, z.B. Art des Wachstumssubstrats, Konzentration des Substrats und des Cosubstrats oder Zeitpunkt der ersten Zugabe des Cosubstrats[2,18,46,63,64,81,82,103]. Deshalb mußten zunächst geeignete Bedingungen für die Anzucht von Bakterien mit Alkanen und Arenen erprobt werden, bevor im Anschluß daran versucht wurde, Tetralin als Cosubstrat zu oxidieren.

3.1. Zellmassegewinnung im Schikanenkolben

Bei Wachstumsversuchen mit Kohlenwasserstoffen als Kohlenstoff- und Energiequelle treten experimentelle Probleme auf, die man von der Anzucht mit wasserlöslichen Stoffen (z.B. Glucose) nicht kennt[47]. Bei der Anzucht größerer Zellmengen liegt der Hauptteil des Substrats als hydrophobe Phase in Form kleiner Tröpfchen (z.B. Octan) bzw. Partikel (z.B. Naphthalin) vor; nur ein sehr geringer Anteil ist in der wäßrigen Phase gelöst (s.Tab.1, S.19 und Abb.8, S.21). Daraus ergeben sich Schwierigkeiten bei der Probenahme, der Messung des Bakterienwachstums und der Zellernte.

Wegen der Heterogenität der Kultur gelangten bei der Entnahme einer Probe mal mehr und mal weniger Anteile der beiden flüssigen Phasen in die Pipette. Entsprechend der unterschiedlichen Verteilung der Bakterien in beiden Phasen schwankte die zu messende Zellzahl oder -dichte. Zusätzlich erschwert wurde die mikroskopische Auszählung durch Zell-Kohlenwasserstoff-Agglomerate und die

OD-Bestimmung durch die während der Messung auftretende Phasentrennung, d.h. wenn Kohlenwasserstofftröpfchen in der Küvette nach oben stiegen oder Kohlenwasserstoffpartikel nach unten sanken. Dies hatte bei Parallelbestimmungen eine sehr große Schwankungsbreite oder zwischen zwei aufeinanderfolgenden Meßpunkten Schwankungen zur Folge, die nicht auf entsprechende Änderungen der Bakterienkultur zurückzuführen waren.

Bei der Zentrifugation störten die in der Kulturflüssigkeit verbliebenen Kohlenwasserstoffe die Abtrennung der Zellen beträchtlich. Zellen von P.aeruginosa AS 47 ließen sich nach dem Wachstum mit Hexadecan nur zu 66% sedimentieren. Der Rest schwamm zusammen mit dem verbliebenen Hexadecan an der Oberfläche. Durch Waschen der Zellen mit einem Lösungsmittelgemisch aus Ethanol, Butanol und Chloroform (10:10:1), das der Kultur zu 10% zugesetzt wurde, konnten die Zellen zwar nahezu vollständig sedimentiert werden; aber während dieser Prozedur verloren 99% der Zellen ihre Keimfähigkeit.

Ein weiteres Problem bestand in der Flüchtigkeit der Kohlenwasserstoffe. Wegen ihres relativ hohen Dampfdrucks (siehe Abb.7, S.20) wurde während des Wachstums ein nicht bestimmbarer Teil des Substrats (z.B. Octan oder Naphthalin) verflüchtigt, so daß eine genaue Ertragsbestimmung nicht durchgeführt werden konnte. Um die Substratverflüchtigung zu verhindern, wurden deshalb besondere Schikanenkolben verwandt, die mit Schraubkappen fest verschlossen werden konnten. Dabei mußte allerdings dafür gesorgt werden, daß über der Kultur noch ein ausreichendes Luftvolumen vorhanden war, damit die Bakterien ohne Sauerstofflimitierung wachsen konnten (siehe II.6., S.12).

3.1.1. Wachstum mit flüssigen Kohlenwasserstoffen

Die Bakterienstämme P.aeruginosa AS 47 und A.faecalis AS 72 wurden in Schikanenkolben mit den flüssigen Alkanen n-Heptan, n-Octan und n-Hexadecan, wie in II.6. und 7. beschrieben, angezogen. Dabei dienten nicht gewaschene Bakterien aus Vorkulturen, die mit Nährbouillon (Roll- oder Schüttelkulturen) oder Alkanen (Schüttelkulturen) gewachsen waren, als Inoculum. Die Wachstumskurven für die verschiedenen Stämme und Substrate sind in Abb.13, 14 und 15 dargestellt.

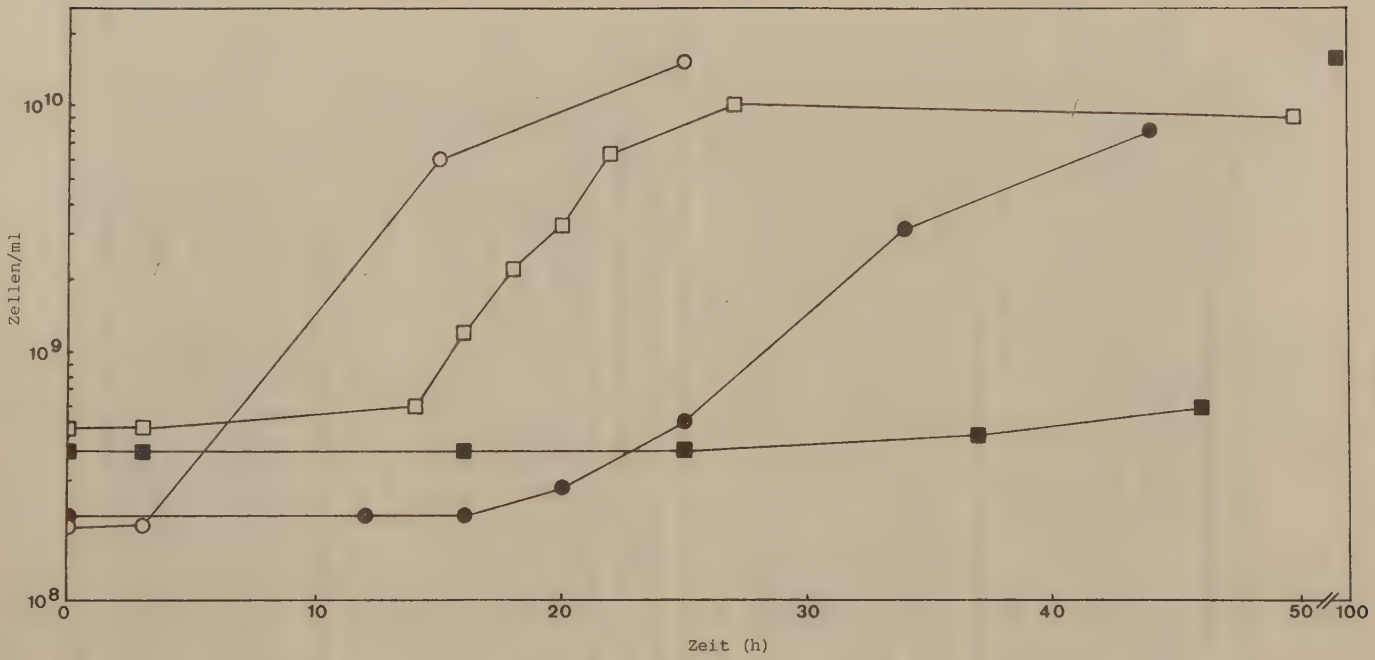


Abb.13: Einfluß der Vorkultur auf das Wachstum von A.faecalis AS 72 mit Heptan

Bakterien wurden jeweils in der experimentellen Phase, nach Voranzucht in einer Heptan-Schüttelkultur oder nach 4,5 oder 6 Stunden Wachstum in einer NB-Rollkultur, in frische Nährlösung überimpft und mit 20 mM Heptan angezogen (siehe II.6., S.12)

● Heptan-Vorkultur
□ NB-Vorkultur (5 h)
o NB-Vorkultur (4 h)
■ NB-Vorkultur (6 h)

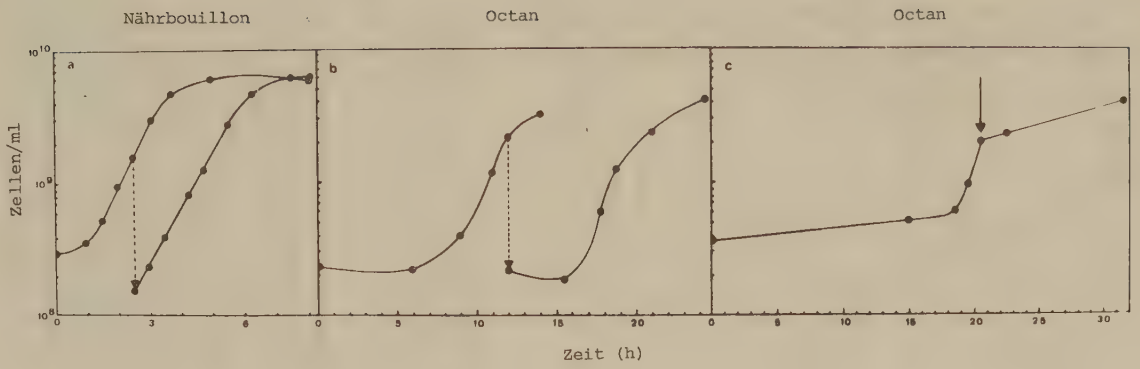


Abb.14: Wachstum von A.faecalis AS 72 mit verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen

Bakterien wurden in Schüttelkulturen, wie in II.6. beschrieben, angezogen. Der Pfeil in 14a und b markiert den Zeitpunkt des Überimpfens in eine neue Nährlösung; der Pfeil in 2c bezeichnet den Zeitpunkt der Zugabe von zusätzlichem Octan (20 mM) zur wachsenden Kultur.

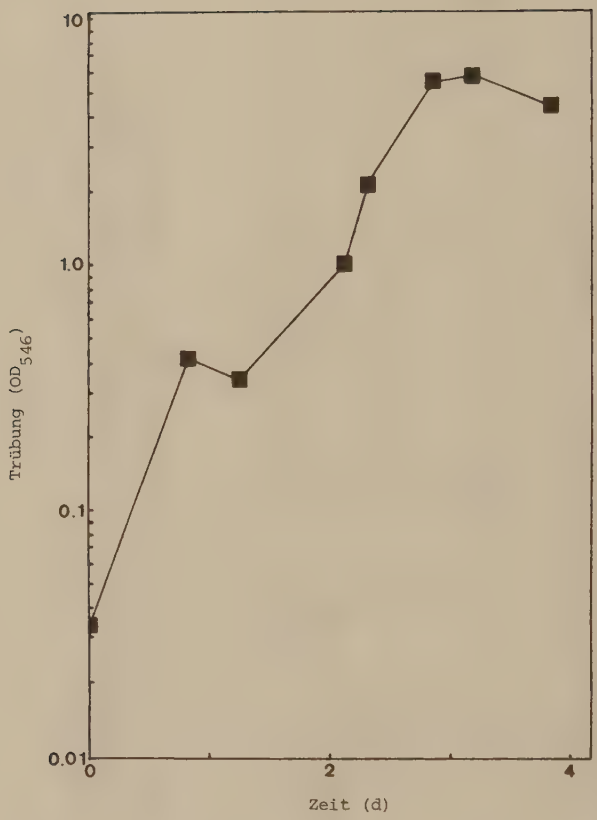


Abb.15: Wachstum von P.aeruginosa AS 47 mit Hexadecan

Bakterien aus einer Hexadecan-Vorkultur wurden in frische Nährsalzlösung überimpft und mit flüssigem Hexadecan (40 mM) angezogen (siehe II.6. u. 7.2., S.12 u. 14).

Bei allen Wachstumsversuchen mit flüssigen Alkanen wurde eine lag-Phase von mindestens 4 Stunden beobachtet. A.faecalis AS 72 wurde mit Heptan oder Octan, jeweils 20 mM, angezogen. Für die Anzucht mit Heptan wurden 4, 5 und 6 Stunden alte NB-Rollkulturen verwandt. Obwohl sich alle Vorkulturen noch in der exponentiellen Phase befanden, waren die lag-Phasen vor Beginn der Heptanverwertung mit 4, 13 und 45 Stunden sehr unterschiedlich (s.Abb.13,S.46). Bakterien aus

einer exponentiell mit Heptan wachsenden Vorkultur hatten eine lag-Phase von ca. 20 Stunden. In Abb.14 sind die Wachstumskurven für A.faecalis AS 72 mit einem wasserlöslichen Substrat (Nährbouillon) und mit Octan wiedergegeben. Beim Überimpfen aus einer NB-Kultur in eine neue trat erwartungsgemäß keine lag-Phase auf (Abb.14a). Doch nach dem Überimpfen von exponentiell mit Octan wachsenden Bakterien in eine neue Octankultur trat eine lag-Phase von ca. 4 Stunden auf (Abb.14b). Abb.14c zeigt, daß das exponentielle Wachstum auch durch Nachfüttern mit Octan stark verlangsamt wird.

P.aeruginosa AS 47 wurde mit Hexadecan angezogen. Mit Nährbouillon gewachsene Zellen wuchsen erst nach 5 bis 6 Tagen an. Dagegen hatten die Zellen, die mit Hexadecan angezogen worden waren, nur eine lag-Phase von 1 bis 2 Tagen (s.Abb.15). Hier fällt eine vorübergehende, geringfügige Abnahme der Trübung, nach anfänglicher Zunahme, auf. Derselbe Effekt trat auch beim Wachstum von A.faecalis AS 72 mit Octan auf, wo der Zelltiter abzunehmen schien. Dies ist vermutlich auf die Verwertung von mit den Zellen überimpften Nährstoffen der Vorkultur zurückzuführen. Ebenso könnten hier Veränderungen der Emulsion durch die Bildung bakterieller Emulgatoren eine Rolle spielen[43,86,87,119,120,121].

3.1.2. Wachstum mit dampfförmig zugeführten Kohlenwasserstoffen

Bei der Erstellung von Substratspektren hatte sich gezeigt, daß P.aeruginosa AS 47 auf Minimalagar auch in Gegenwart von Octandampf wuchs. In der Flüssigkultur mit emulgiertem Octan (5, 10 und 20 mM) konnte jedoch auch nach 40 Tagen kein Wachstum festgestellt werden. Auch durch die Erhöhung der Magnesiumsulfatkonzentration auf eine Endkonzentration im Medium von 5 mM, wie von van Eyck und Bartels[111] für die Anzucht von P.aeruginosa Stamm 473 mit Alkanen angegeben, gelang es nicht, die Bakterien mit Octan zu vermehren.

Die Löslichkeit von Alkanen steigt mit abnehmender Kettenlänge (siehe Tab.1, S.19). Im gleichen Sinn nimmt die antimikrobielle Wirkung der Alkane auf Mikroorganismen zu[80]. Die Erklärung für das ausbleibende Wachstum von P.aeruginosa AS 47 in der Flüssigkultur

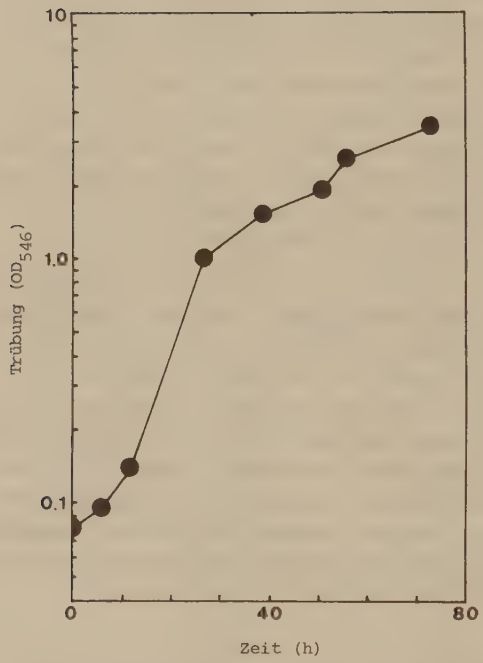


Abb.16: Wachstum von A.faecalis AS 72 mit dampfförmig zugeführtem Octan

Bakterien von einer Succinat-Platte wurden in einer Nährsalzlösung mit Octandampf inkubiert (siehe II.6 und 7.2., S.12 und 14).

lag also möglicherweise darin, daß hier die Konzentration des in der Flüssigkeit gelösten Octans und/oder das zusätzlich vorhandene, nicht gelöste Octan auf die Bakterien wachstumshemmend wirkte. Deshalb wurde bei den folgenden Versuchen eine Form der Substratzugabe gewählt, bei der die Konzentration des in der Nährlösung gelösten Octans möglichst klein bleibt und die Zellen nicht mit flüssigem, emulgiertem Octan in Berührung kommen[33].

Wie in II.7.2. (S.14) beschrieben, wurden die Schikanenkolben jeweils mit einem Einhängeröhrchen versehen, das Octan enthielt. Der Octandampf konnte durch ein Loch in den Gasraum über der Kulturflüssigkeit diffundieren. Das Wachstum von A.faecalis AS 72, einem Stamm, der auch mit flüssigem Octan wächst, mit dampfförmig zugeführtem Octan, ist in Abb.16 dargestellt. Bis zu einer Zelldichte von etwa

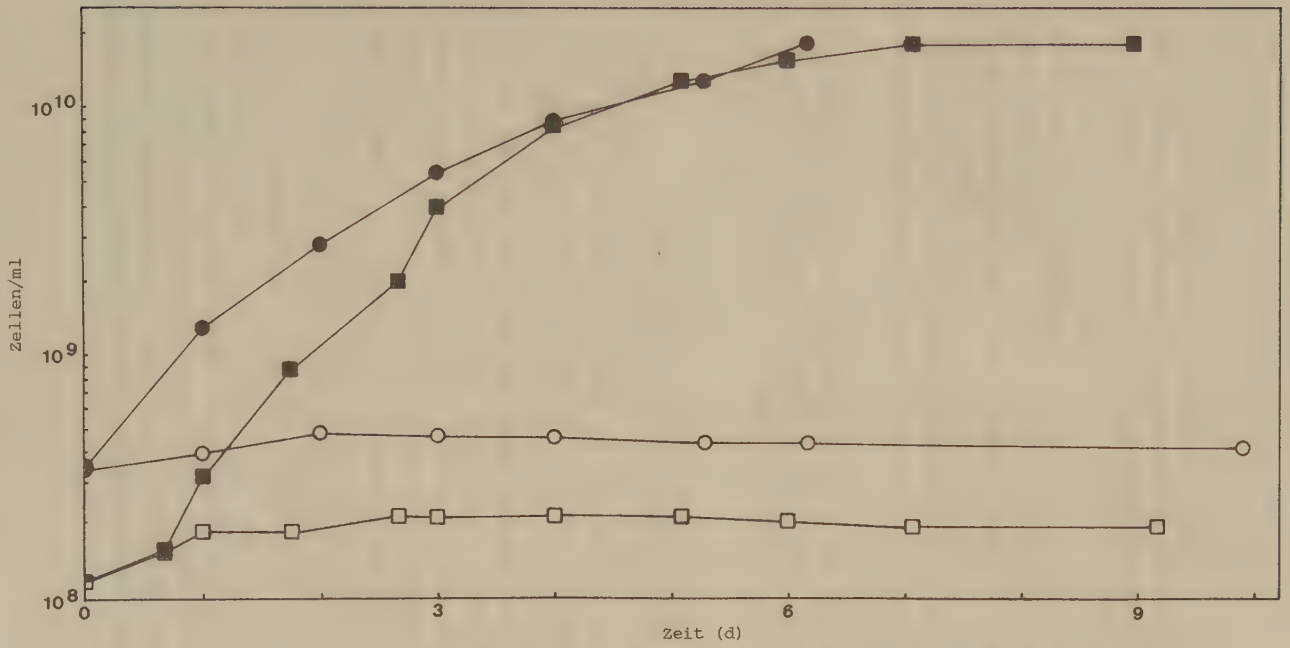


Abb.17: Wachstum von P.aeruginosa AS 47 mit flüssig oder dampfförmig zugeführtem Octan

Bakterien aus einer Octanvorkultur wurden in frische Nährsalzlösung überimpft und mit Octan angezogen (siehe II.6. und 7.2., (S.13 und 14)

■ Dampfförmiges Octan (Inoculum 1%) ● Dampfförmiges Octan (Inoculum 7%)

○ Flüssiges Octan (Inoculum 7%) □ Ohne Octan (Inoculum 1%)

$OD_{546} = 1$ scheint die Octankonzentration in der Flüssigkeit und der Dampfphase darüber für eine exponentielle Vermehrung auszureichen. Danach ist vermutlich die Octan-Aufnahme durch die Bakterien wachstumslimitierend.

Mit derselben Methode gelang es auch, P.aeruginosa AS 47 mit Octandampf anzuziehen (siehe Abb.17, S.51). Zellen von einer Octan-Vorkultur wurden auf 4 Schikanenkolben, die frische Nährsalzlösung enthielten, verteilt. Zwei Kulturen mit verschiedenen Inocula (7 bzw. 1%; siehe II.6, S.12) wurden mit dampfförmigem und eine mit flüssigem Octan inkubiert; der vierte Kolben wurde ohne Kohlenstoffquelle geschüttelt.

Das Wachstum verlief bis zu einem Zelltiter von 5×10^9 Zellen/ml exponentiell; danach war die Octanzufuhr vermutlich limitierend. In Gegenwart von flüssigem Octan wuchsen die Bakterien dagegen nicht.

3.1.3. Wachstum mit festen Kohlenwasserstoffen

Mit festem Naphthalin wurden P.aeruginosa AS 47 und P.stutzeri AS 39 angezogen. Das Naphthalin wurde in pulverisierter Form in die Nährsalzlösung gegeben. Während der Inkubation auf dem Rotationsschüttler bildeten sich größere Naphthalinklumpen, die bei der Probenahme zum Teil in die Pipette gelangten und diese manchmal verstopften. Um diese Störungen zu umgehen, wurde der Schikanenkolben vor der Entnahme einer Probe geschüttelt und die Pipette in den oberen Bereich der Flüssigkeit getaucht, in der sich nur kleinere Naphthalinpartikel befanden. Auch diese störten jedoch, wenn sie bei der OD-Messung in die Küvette gelangten. Sie führten zu starken Schwankungen in der Wachstumskurve (siehe Abb.18, S.53).

Bei der Anzucht mit 50 mM Naphthalin wurde eine maximale Zelldichte von $OD_{546} = 3$ erreicht. Die exponentielle Phase reichte jedoch nur bis etwa $OD_{546} = 0{,}9$. Danach wurde die Wachstumsrate von dem in Lösung befindlichen Naphthalin limitiert. Das heißt, der Lösungsvorgang war langsamer als der Verbrauch durch die Bakterien. Es konnte gezeigt werden, daß die Wachstumsrate wieder zunahm, wenn die Naphthalinklumpen mit Hilfe einer Pipette zerkleinert wurden.

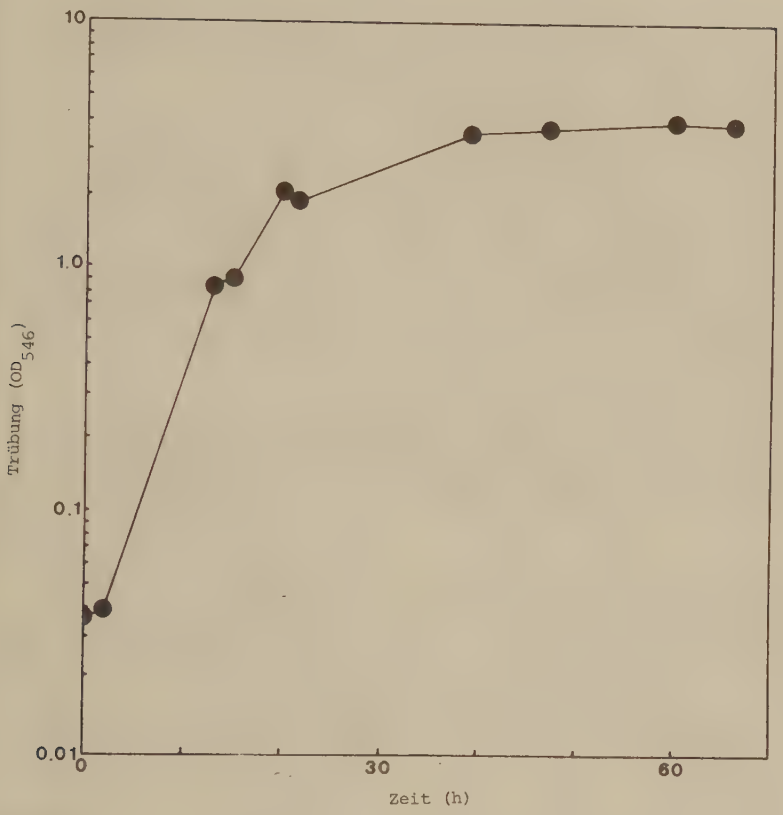


Abb.18: Wachstum von P.aeruginosa AS 47 mit Naphthalin

Spätlogarithmische Zellen aus einer Naphthalin-Vorkultur wurden in 50 ml Nährlösung mit pulverisiertem Naphthalin (50 mM) inkubiert (siehe II.6. und 7.2., S.12 und 14). Nach 22 h waren noch Naphthalin-Partikel in der Lösung, die die Trübungsmessung beeinträchtigten.

Die experimentelle Durchführung von Cooxidationsversuchen würde wesentlich vereinfacht, wenn man die Bakterien anstelle von Naphthalin z.B. mit Salicylat, anziehen könnte. Die Enzyme des Abbaus von Naphthalin bis zum Salicylat werden in Pseudomonas NCIB 9816 und

P.putida PpG 7 und ATCC 17483 auch beim Wachstum mit Salicylat induziert[5,93]. Deshalb wurde untersucht, ob dies auch bei der Anzucht von P.aeruginosa AS 47 mit Salicylat geschieht.

P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47 wurden mit Salicylat angezogen, in der exponentiellen Phase geerntet, mit Phosphatpuffer gewaschen und in einer Nährlösung resuspendiert, die mit Naphthalin (50 mM) versehen wurde. Da die Bakterien ohne lag-Phase mit Naphthalin anwuchsen (s.Abb.19), kann angenommen werden, daß die Enzyme des Naphthalinabbauwegs beim Wachstum mit Salicylat bereits induziert wurden. Mit Succinat angezogene Zellen hatten eine lag-Phase von 36 Stunden.

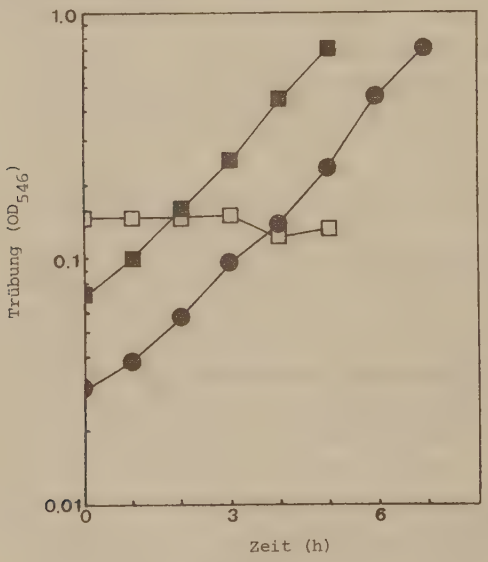


Abb.19: Induzierbarkeit des Naphthalinwegs in P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47

Mit 20 mM Salicylat als Induktor oder 40 mM Succinat angezogene Bakterien wurden in Phosphatpuffer gewaschen, in frischer Nährlösung resuspendiert und mit pulverisiertem Naphthalin (50 mM) angezogen (siehe II.6. und 7.2., S.12 und 14).

■ P.stutzeri AS 39 mit Salicylat angezogen

□ P.stutzeri AS 39 mit Succinat angezogen

● P.aeruginosa AS 47 mit Salicylat angezogen

Eine andere Möglichkeit der Vereinfachung von Wachstumsversuchen bot die bereits für flüssige, emulgierte Kohlenwasserstoffe beschriebene Methode. Bei der Anzucht von Bakterien mit dampfförmigem Octan (siehe S.49f) wurde nicht nur - durch die geringere Substratkonzentration - die Toxizitätsgrenze unterschritten. Vielmehr fielen auch die mit emulgierten Substraten verbundenen Beeinträchtigungen der

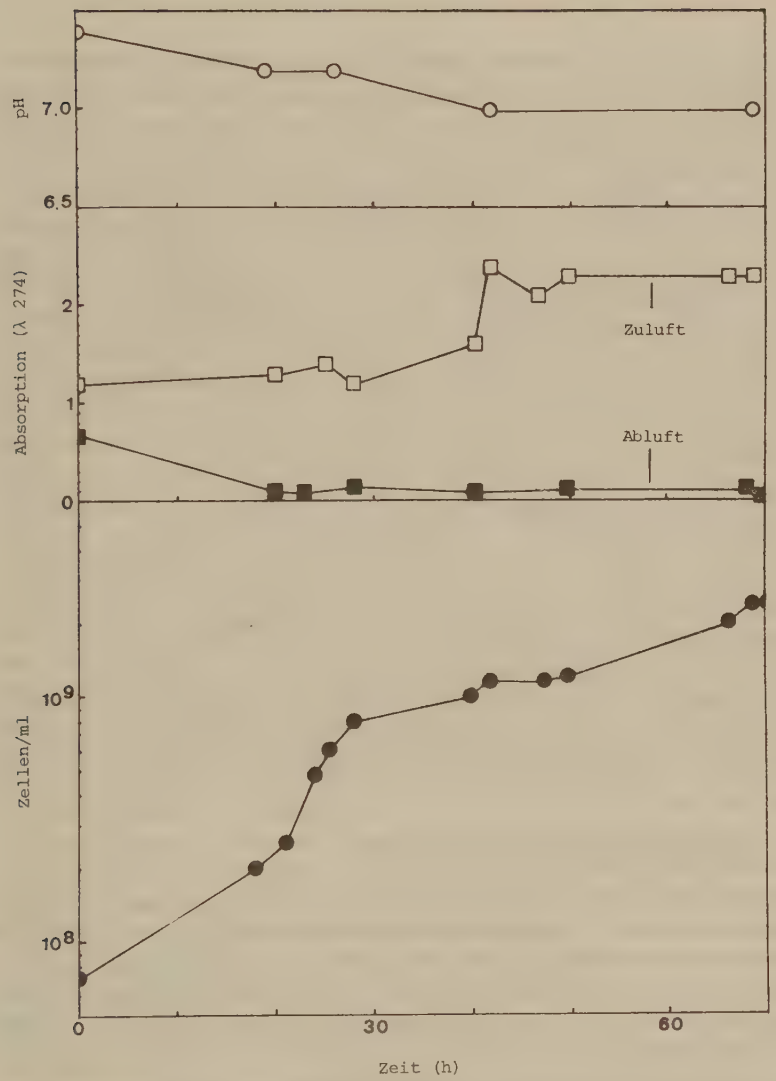


Abb.20: Wachstum von P.aeruginosa AS 47 mit dampfförmig zugeführtem Naphthalin

Bakterien von einer Naphthalinplatte wurden in 200 ml Nährlösung überimpft und im Blasensäulenrohr mit Naphthalindampf angezogen (siehe II.6., 7.2., S.12,14). Die Naphthalinströmungsrate wurde photometrisch bestimmt (siehe II.8., S.15). Die Berechnung der Naphthalinmenge erfolgte gemäß Tab.3, S.27). Die Naphthalinzufuhrrate schwankte stark (1,1 ± 0,2 bis 1,75 ± 0,1), weil Naphthalin noch nicht auf Papierstreifen fixiert (siehe Abb.6, S.13), sondern lose ins Vorratsgefäß getan wurde. Generationszeit: 3,8 h (aus dem steilsten geradlinigen Kurvenabschnitt ermittelt).

experimentellen Durchführung fort. Deshalb sollte diese vorteilhafte Methode auch bei der Anzucht mit Naphthalin verwendet werden.

Naphthalin hat einen wesentlich niedrigeren Dampfdruck als Octan (siehe Abb.7, S.20). Daher reichte die Dampfkonzentration nicht aus, wenn das Substrat in ein Einhängeröhrchen getan wurde. Naphthalin mußte stattdessen mit dem Luftstrom in die Kultur eingetragen werden (siehe II.7.2., S.14). Für Vorversuche mit P.aeruginosa AS 47 wurde ein Glaszylinder benutzt, in den die Luft und der Naphthalindampf über eine Fritte gelangten (siehe II.6., S.12). Mit Hilfe der in II.8. und III.1.3. (S.15 und 25) beschriebenen Kartuschen-Meßtechnik konnte der Substratgehalt in der Zuluft und in der Abluft bestimmt werden. In Abb.20 (S.55) ist das Wachstum von P.aeruginosa AS 47 mit Naphthalindampf dargestellt. Da die Erzeugung des Naphthalindampfes bei diesem Versuch technisch noch nicht vollkommen war, schwankte die Naphthalinzufuhrrate in der Zuluft zwischen 0.9 und 1.8 mg/h. Als die Kultur einen Titer von 5×10^8 Zellen/ml erreicht hatte, konnte in der Abluft mit Hilfe der Kartuschen kein Naphthalin mehr nachgewiesen werden. In der Abluft wurde auch kein Naphthalingeruch mehr festgestellt. Die Zellzunahme erfolgte bis zu diesem Zeitpunkt exponentiell. Danach knickte die Wachstumskurve ab. Nach der Erhöhung der Naphthalinzufuhrrate von $1,1 \pm 0,2$ auf $1,75 \pm 0,1$ nahm die Wachstumsrate geringfügig zu. Der pH-Wert fiel während des Wachstumsversuchs von 7,4 auf 7,0.

3.2. Zellmassegewinnung im Fermenter

Für die intensive Untersuchung der bakteriellen Verwertung von Kohlenwasserstoffen eignen sich am besten Fermenter. In ihnen wird eine bessere Sauerstoffeintragung und bessere Substratverteilung (Emulgierung der schlecht löslichen Kohlenwasserstoffe) als im Schikanenkolben erreicht. Auch die unabhängige Steuerung der Belüftung und der Flüssigkeitsumwälzung, unerläßlich für physiologische Untersuchungen, ist mit Fermentern durchführbar.

A.faecalis AS 72 wurde im Fermenter in 3,8 l Nährlösung mit Octan angezogen. Die Kultur wurde mit 80 ml einer exponentiell wachsenden

Octanvorkultur beimpft. Die Anfangskonzentration von Octan war 20 mM. In Abb.21 (S.58) ist der Logarithmus des Zelltiters wiedergegeben. Schon 1 Stunde nach Versuchsbeginn bildeten sich große Schaumblasen auf der Kultur, in denen Zellklumpen zu erkennen waren. Zehn Stunden lang nahm die Schaumbildung allmählich zu, ohne daß in den Proben, die der Kulturflüssigkeit entnommen wurden, eine entsprechende Zellzunahme beobachtet wurde. Nach insgesamt 25 Stunden war keine Zellzunahme in der flüssigen Phase festzustellen. Octan mußte zum Ausgleich der Verdunstungsverluste (etwa 3,3 ml/h) mehrmals nachgefüttert werden. Der Fermenter wurde nun mit weiteren 80 ml einer exponentiell wachsenden Octanvorkultur beimpft. 3,5 Stunden danach nahm die Zellzahl in der Kulturflüssigkeit erstmals meßbar zu. Gleichzeitig stieg die Schaumschicht bis zum Fermenterdeckel an, wurde immer dichter, bis die Kultur schließlich überschäumte. Die Wachstumskurve verlief nun exponentiell. Durch die Zugabe von Silikonantischaummittel konnte die Schaumbildung nur vorübergehend verhindert und die Zellzunahmerate in der Kulturflüssigkeit gesteigert werden. Bei 4×10^9 Zellen/ml stagnierte das Zellwachstum. Durch Zugabe von Octan konnte kein weiteres Zellwachstum erzielt werden. Auch bei der Anzucht von P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47 trat Schaumbildung auf.- Unter den beschriebenen Bedingungen konnten weder Wachstums- noch Cooxidationsversuche erfolgreich durchgeführt werden: (1) Die erzielte Zelldichte reichte nicht aus für Versuche zum Abbau von Tetralin mit nicht wachsenden Bakterienzellen (s.III.4.2.1., S.79). (2) Bei der starken Schaumbildung konnten Versuche in Gegenwart eines Wachstumssubstrats und Tetralin als Cosubstrat nicht durchgeführt werden, weil die jeweilige tatsächliche Wachstumsphase nicht bestimmbar war, die aktiven Zellen zum großen Teil sofort in den Schaum wanderten und durch das Überschäumen von Zellen eine Bestimmung der Tetralinabnahme in der Abluft verhindert wurde. Deshalb wurde zunächst nach Möglichkeiten gesucht, die Schaumentwicklung zu bekämpfen.

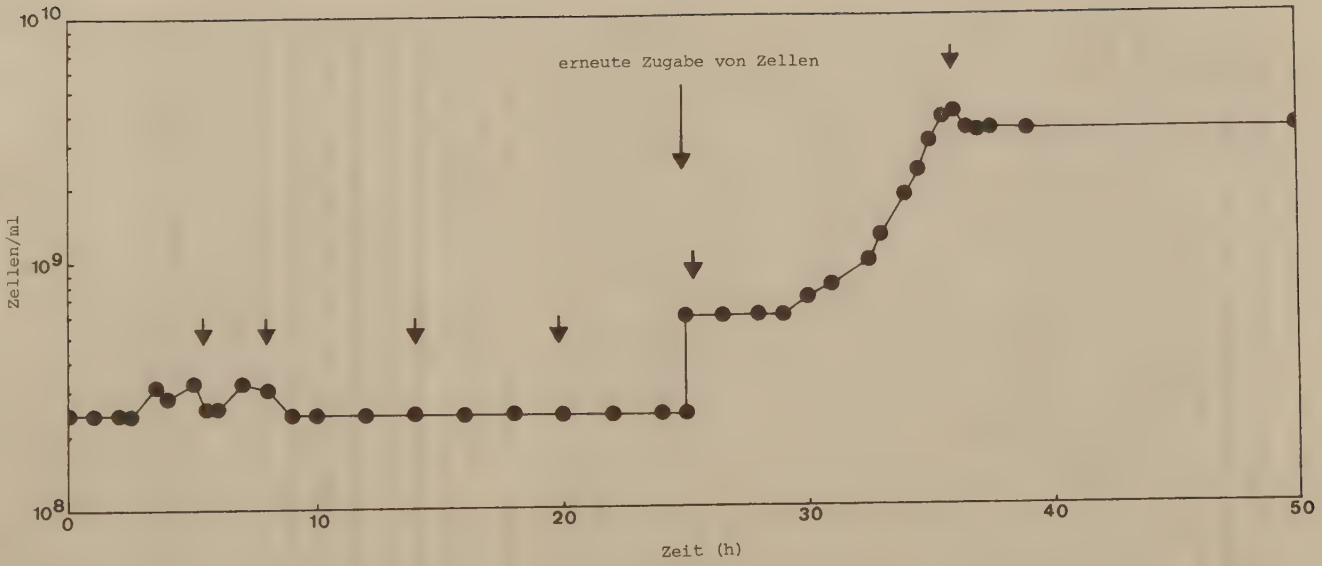


Abb.21: Beeinträchtigung des Bakterienwachstums im Fermenter infolge starker Schaumbildung

A.faecalis AS 72 wurde im Fermenter mit Octan angezogen. Die Zeitpunkte, zu denen Octan nachgefüttert wurde, sind durch Pfeile gekennzeichnet. (Näheres s.Text).

3.2.1. Entwicklung eines neuen mechanischen Entschäumers

Das Problem der Schaumentwicklung ist in der Biotechnologie seit langem bekannt. Wegen der starken Umwälzung und der Belüftung mit Preßluft treten in Fermentern wesentlich höhere Scherkräfte und folglich mehr Schaum auf als in anderen Flüssigkulturen. Grundsätzlich kann man mit 2 verschiedenen Methoden gegen zu starke Schaumentwicklung angehen: (1) Man kann dem Medium sogenannte Antischaummittel (Silikone) zugeben; der Nachteil ist dabei, daß diese physiologische Nebenwirkungen bei den Bakterien haben [98,108] und daß sie koaleszensfördernd sind, d.h. der erwünschten, durch die starke Verwirbelung erzeugten Feinverteilung der Luftblasen gerade entgegenwirken. (2) Man kann den Schaum mechanisch zerstören; hierfür sind verschiedene Entschäumer entwickelt worden. Diese kommen jedoch wegen ihrer technischen Aufwendigkeit nicht für den Einsatz in kleinen Laborfermentern infrage.

Zunächst wurde versucht, das Überschäumen von Bakterien mit Hilfe von rotierenden Metallscheiben, die auf dem Turbinenläufer befestigt wurden, zu verhindern. In einer Versuchsreihe wurden auf dem Turbinenläufer 1, 2 bzw. 3 Drehscheiben montiert. P.aeruginosa AS 47 wurde jeweils unter denselben Bedingungen mit Succinat angezogen. In Abb.22a bis d ist die jeweilige Ausführungsform der Drehscheiben skizziert und je ein charakteristischer Wachstumsversuch dargestellt. Nach ca. 4 bis 5 Stunden war die Schaumbildung jeweils so groß, daß die Bakterienzellen überschäumten und die Trübung der Kulturflüssigkeit nicht mehr zunahm. Im Versuch ohne Drehscheibe erreichten die Bakterien dieselbe Zelldichte wie mit einer Drehscheibe; sie wuchsen jedoch etwas langsamer. Der Vorteil der Drehscheibe liegt vermutlich darin, daß sie den aufsteigenden Schaum in Richtung Gefäßwand schleudern und dadurch die Bakterien in die Flüssigkeit zurückgeführt werden.

Die höchste Zelldichte wurde mit zwei übereinander angeordneten Drehscheiben erzielt. Die Verwendung einer dritten Drehscheibe oder das Verstellen des Abluftrohres führte zu keiner weiteren Verbesserung der Wachstumsbedingungen.

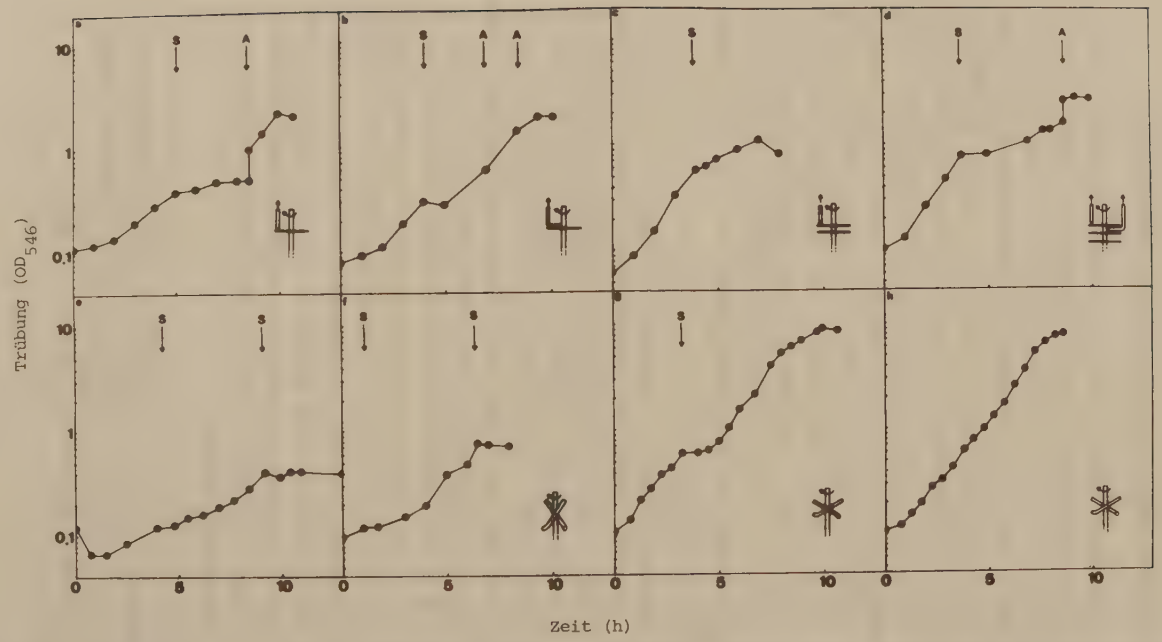


Abb.22: Verbesserung der Wachstumsbedingungen im Fermenter durch einen neuen mechanischen Entschäumer [a)]

P.aerugionosa AS 47 wurde in 3,6 l Nährlösung mit 20 mM Succinat angezogen (siehe II.6., S.12). Als Inoculum dienten 80 bis 160 ml einer TBY-Vorkultur. Die Belüftungsrate betrug 0,8 l/min, die Drehzahl 600 upm. Die Vorrichtungen zur Entschäumung sind als Querschnittzeichnung, parallel zum Turbinenläufer, skizziert. In 22a), b) und c) wurde der Wachstumsversuch nach Zugabe der übergeschäumten Zellsuspension mit Hilfe von Silikon-Antischaummittel fortgesetzt. - Um die Wirkung des Entschäumers auch bei höherer Zelldichte ($OD_{546}>2$) zu prüfen, wurde in 22g) u. h) mit Succinat nachgefüttert. Durch Zugabe von Phosphorsäure (3M) wurde verhindert, daß der pH-Wert über 7,4 anstieg. Die Drehzahl wurde auf 800 upm, die Luftzufuhrrate auf 3,6 l/min erhöht.

A Zugabe von Antischaummittel (übergeschäumte Bakterien wurden vorher in den Fermenter zurückbefördert)

S starke Schaumbildung, verbunden mit dem Austritt von Zellen aus dem Fermenter

a) siehe S.62

In mehreren Versuchen wurden die aus dem Fermenter verdrängten Bakterien (bis zu 50% der gebildeten Zellmasse) wieder zurückgeführt und Antischaummittel zugegeben (s.Abb.22a,b und d). Die Trübung nahm danach zwar weiter zu, aber es kam erneut zu starker Schaumbildung. Die eingeblasene Luft wurde in Gegenwart des Antischaummittels nur sehr schlecht verteilt, und die schnell koaleszierenden Luftblasen beeinträchtigten die Umwälzung der Kulturflüssigkeit.

In allen Versuchen, bei denen Drehscheiben zur Schaumbekämpfung eingesetzt worden waren, hatte sich über der gut umgewälzten Kulturflüssigkeit, die sehr wenig Bakterien enthielt, eine immer dichter werdende Schaumschicht gebildet, die schließlich etwa die Hälfte der Zellmasse enthielt und mit der Abluft aus dem Fermenter verdrängt wurde. Deshalb wurde nun nach einer Vorrichtung gesucht, die kontinuierlich einen Teil der Kulturflüssigkeit in die Schaumschicht beförderte und den Schaum dadurch in die Umwälzung einbezog. Dadurch sollten auch die im Schaum befindlichen Bakterien mit Nährstoffen versorgt werden und sich weiter vermehren können. Dies wurde mit 2 gebogenen Stahlrohren erreicht, die radialsymmetrisch am Turbinenläufer befestigt waren und im Betriebszustand mit jeweils einem Ende in die Kulturflüssigkeit eintauchten (siehe Abb.23, S.62). Dabei waren die Rohre zur Längsachse des Turbinenläufers so geneigt, daß sie schaufelartig Flüssigkeit aufnehmen und durch die Schaumschicht hindurchleiten konnten. Hiermit wurde die erwünschte kontinuierliche Umwälzung und die Vermischung des Schaums mit der Flüssigkeit erreicht. Es gab im Fermenter keine Zonen mehr, in denen der Schaum zum Stillstand kommen konnte.

Die Wachstumsversuche mit diesem neuartigen mechanischen Entschäumer sind in Abb.22f, g und h dargestellt (siehe S.60). Der Entschäumer verhinderte das Überschäumen vollständig auch bei hoher Zelldichte ($OD_{546} = 9$). Die Effektivität des Entschäumers war von der Stellung der Rohre zum Turbinenläufer abhängig. Bei einem Stellwinkel von 30° war der Entschäumer nicht wirksam; die erreichte Zelldichte lag bei $OD_{546} = 0,8$ (s.Abb.22f). Die beste Wirkung wurde bei einem Stellwinkel von 60° erzielt (s.Abb.22g und h). In einem Versuch wurden die in die Flüssigkeit eintauchenden Rohrenden mit Gummistopfen verschlossen (s.Abb.22g). Auch so war der Entschäumer wirksam. Es kam jedoch nach 3 Stunden zum Überschäumen der Kultur.

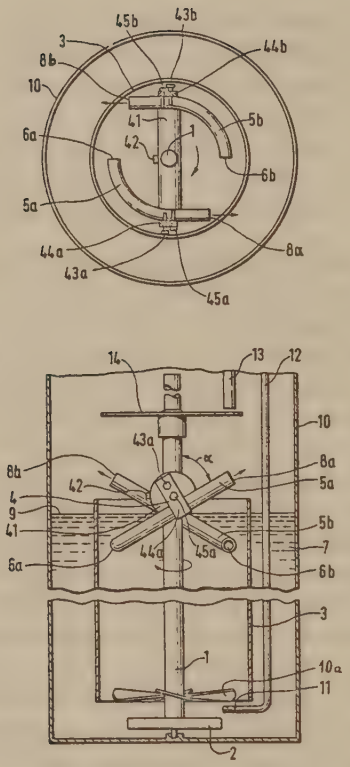


Abb.23: Mechanischer Entschäumer

Die Zeichnung wurde der Patentanmeldung entnommen[10]. Die in der Seitenansicht (a) und in der Aufsicht (b) angegebenen Nummern bedeuten:

1 Rotorwelle
2 Magnet
3 Umwurfzylinder
4 Halterung
5a,b Hohlstab
6a,b Eintrittsöffnung
7 Flüssigkeit
8a,b Austrittsöffnung
9 Flüssigkeitsspiegel
10 Gefäßwand
11 Düsen
12 Rohr
13 Rohr
14 Drehscheibe
41 Trägerstange
42 Feststellschraube
43a,b Distanzschraube
44a,b Haltebügel
45a,b Halteschraube

Durch das Ablassen von 160 ml Kulturflüssigkeit konnte die Wirksamkeit des Entschäumers wieder hergestellt werden. Danach wuchsen die Bakterien ohne weiteres Überschäumen bis zu einer maximalen Zelldichte von $OD_{546} = 9,1$. Das legt die Vermutung nahe, daß die Wirkung des Entschäumers zum großen Teil auf Flüssigkeitsstrahlen beruht, die während der Rotation von den Außenwandungen der offenen oder geschlossenen Rohre abprallen und durch die Schaumschicht hindurch zur Fermenterwand gelenkt werden (s.Abb.23). Der Entschäumer wurde bei den im folgenden beschriebenen Wachstums- und Cooxidationsversuchen im Fermenter eingesetzt. Die Erfindung wurde im In- und Ausland zum Patent angemeldet[10,11].

3.2.2. Wachstum mit flüssigen Kohlenwasserstoffen

Es war das Ziel der Wachstums versuche, reproduzierbar und mit möglichst wenigen, während des Fermenterlaufs zu verändernden Parametern, für spätere Cooxidationsversuche mit Tetralin genügend Zellmasse zu gewinnen. Um die Abhängigkeit der Produktbildung von der jeweiligen Wachstumsphase oder der Konzentration des Wachstumssubstrats studieren zu können, wurden die Wachstumskurven bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt.

Der O c t a n verwertende Stamm A.faecalis AS 72 wurde im Fermenter, wie in II.6. (S.12) beschrieben, angezogen. Als Kohlenstoffquelle diente flüssiges Octan. Infolge des niedrigen Dampfdrucks wurde ein Großteil des Substrats jedoch durch den Luftstrom verflüchtigt. Die Luftzufuhrrate wurde deshalb möglichst niedrig gehalten. In 6 Versuchen sollte das für einen möglichst hohen Ertrag günstigste Verhältnis von Luftzufuhrrate und Octankonzentration ermittelt werden. Abb.24 zeigt die Wachstumskurven und den zeitlichen Verlauf des pH-Werts. Die Ertragskoeffizienten wurden aus dem gebildeten Trockengewicht pro Liter und dem e i n g e s e t z t e n Substrat in g berechnet. Die tatsächlich verbrauchte Substratmenge war wegen der erwähnten Verluste nicht bekannt. Der so berechnete Ertragskoeffizient gibt keinen Aufschluß über den Wirkungsgrad der Umsetzung des Octans in Zellmaterial; er erlaubt jedoch eine Beurteilung des zum Umsatz zur Verfügung stehenden Substratanteils bei unterschiedlicher Belüftungsrate.

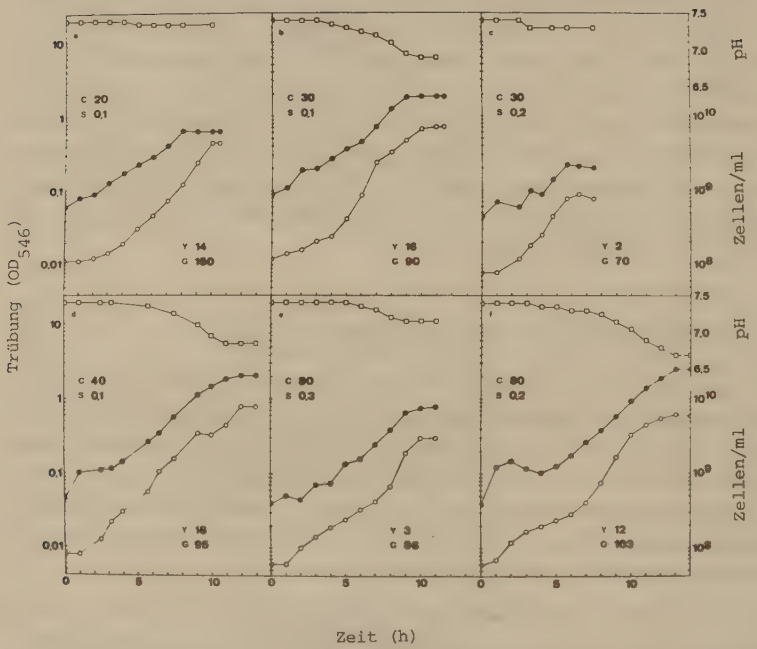


Abb.24: Ermittlung des optimalen Verhältnisses der Octankonzentration zur Luftzufuhrrate für das Wachstum von A.faecalis AS 72

Bakterienzellen aus einer Octan-Vorkultur (50 bis 100 ml) wurden in 3,7 l Nährlösung mit verschiedenen Octankonzentrationen und Luftzufuhrraten im Fermenter angezogen (siehe II.6., S.12); Bestimmung der Wachstumsparameter (siehe II.9., S.15). Da die tatsächlich verbrauchte Substratmenge nicht bestimmt werden konnte, wurde die e i n g e s e t z t e Substratmenge der Berechnung zugrundegelegt. Der Ertragskoeffizient wurde definiert als gebildetes Trockengewicht pro g Substrat × $100.^{102}$-Starke, teilweise meßtechnisch bedingte Schwankungen beeinträchtigen die Interpretation der Wachstumskurven (siehe S.65).

● Trübung (OD_{546})
o Zelltiter
□ pH

S Strömungsrate (l/min)
C Octankonzentration (mM)

Y Ertragskoeffizient (%)
G Generationszeit (min); aus dem steilsten, annähernd geradlinig verlaufendem Abschnitt der Trübungskurve ermittelt.

Der höchste Ertrag, 18%, wurde mit 40 mM Octan bei einer Belüftungsrate von 0,1 l/min erzielt. Da mit Alkanen im allgemeinen ein Substratertrag von 80 bis 100% erzielt wird [32,102], muß ein großer Teil des Substrats verflüchtigt worden sein. Außerdem trat während des exponentiellen Wachstums ein saurer Metabolit auf, da der pH-Wert der Kulturflüssigkeit in Abhängigkeit von der erzielten Zellmasse abnahm.

Die mit 20, 30 und 40 mM Octan bei 0,1 l/min erzielten Erträge waren zueinander direkt proportional (s.Abb.24a,b,d). Eine Verdopplung der Luftzufuhrrate führte zu einer drastischen Verringerung des Ertrags (s.Abb.24b und c), weil das Substrat verflüchtigt wurde. Die Ertragskoeffizienten für das Wachstum mit 30 mM Octan waren bei einer Strömungsrate von 0,1 l/min 16%, bei 0,2 l/min nur 2%. Um eine höhere Zelldichte zu erreichen, wurde die Substratanfangskonzentration auf 80 mM erhöht (s.Abb.24e und f). Zur Verhinderung der Sauerstofflimitierung wurde die Luftzufuhrrate auf 0,2 bzw. 0,3 l/min erhöht. Die maximale Zelldichte war $OD_{546} = 2,55$, der Substratertrag 12%. Bei einem Octan-Luft-Verhältnis von 40:0,1 waren 18% erzielt worden. Zur Erzielung des gleichen Ertrags mit 0,2 l/min muß die Octananfangskonzentration folglich mehr als verdoppelt werden.

Die Generationszeiten beim Wachstum von A.faecalis AS 72 mit Octan wurden aus der Trübungskurve ermittelt; sie lagen zwischen 70 und 150 Minuten. Abgesehen von Schwankungen, die auf generelle Schwierigkeiten bei Messungen des Bakterienwachstums mit emulgierten Substraten zurückzuführen sind, zeigen die Trübungs- und Zellzahlkurven nicht immer eindeutigen sigmoiden Verlauf. Oft treten scheinbar mehrere exponentielle Phasen mit unterschiedlichen Wachstumskonstanten auf (s.Abb.24a,b,e und f). Dies wurde auch von anderen Autoren bei der mikrobiellen Verwertung von Alkanen beobachtet [38,69].

Die Bakterienkulturen zeigten im Fermenter teilweise ähnliches Verhalten wie bei Versuchen im Schikanenkolben. Während die Zelltiterkurve bei den Fermenterkulturen eine lag-Phase von 1 bis 2 Stunden anzeigte, trat bei der Trübungskurve ein sofortiger Anstieg, nach 1 Stunde Stagnation bzw. leichte Abnahme und erst nach 2 bis 4 Stunden exponentieller Verlauf ein. Die lag-Phasen waren bei Fermenterkulturen kürzer, teilweise nur halb so lang wie bei Schüttelkulturen.

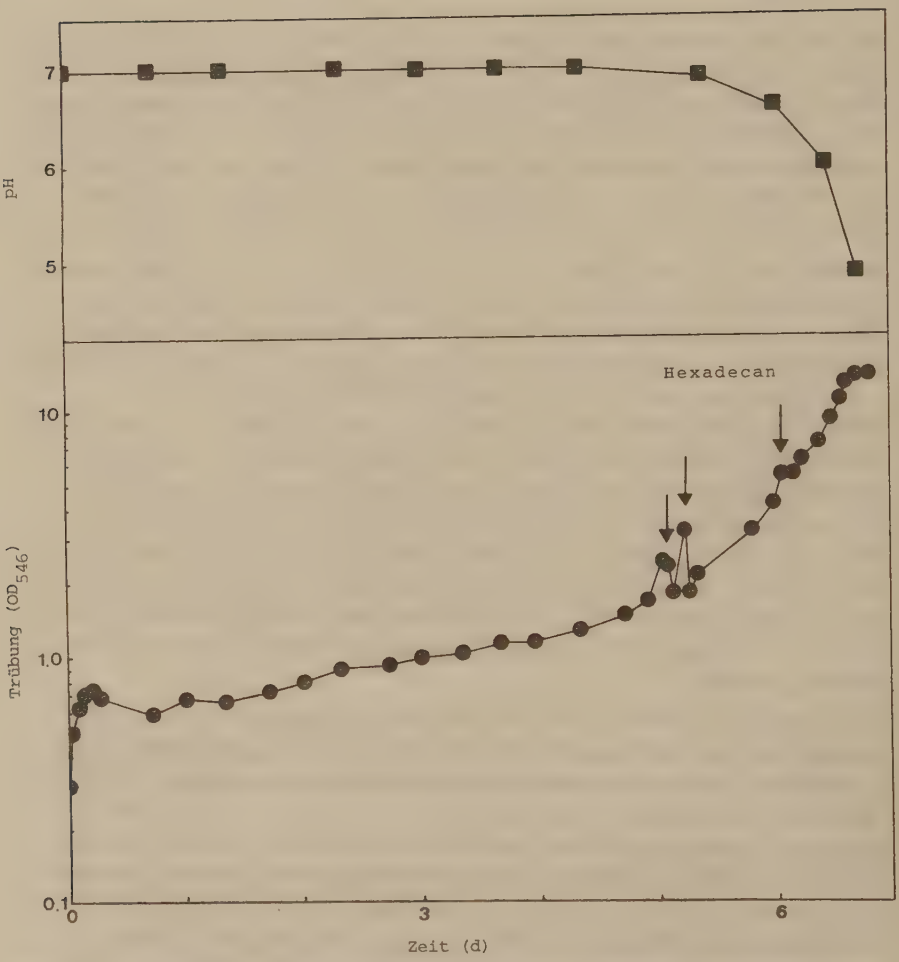


Abb.25: Wachstum von P.aeruginosa AS 47 mit flüssigem Hexadecan

Bakterien aus einer NB-Vorkultur (180 ml) wurden in Nährlösung (3,6 l) mit 42 ml Hexadecan (40 mM) im Fermenter angezogen (siehe II.6., S.12); Bestimmung der Wachstumsparameter siehe II.9., S.15. Während der schnellen Wachstumsphase wurde zum Ausgleich von Verdunstungsverlusten Hexadecan nachgefüttert. Insgesamt wurden 105 ml Hexadecan (100 mM) eingesetzt. Das maximale Trockengewicht betrug 6,9 g/l; die Generationszeit 10 h (während der schnellen Phase) und 84 h (während der langsamen Phase).

● Trübung (OD_{546}); ■ pH

P.aeruginosa AS 47 verwertet, wie in III.3.1. (S.44ff) gezeigt, aliphatische (Octan, Hexadecan) und aromatische (Naphthalin) Kohlenwasserstoffe. Ein Fermenterwachstumsversuch mit diesem Stamm und 40 mM H e x a d e c a n als Kohlenstoffquelle ist in Abb.25 dargestellt. Das Wachstum läßt sich unterteilen in eine langsame und eine schnelle Wachstumsphase mit den Generationszeiten 84 h bzw. 10 h. Für diesen Versuch wurde eine NB-Vorkultur verwendet. Die Dauer der langsamen Wachstumsphase entspricht der lag-Phase, die bei den Vorversuchen im Schikanenkolben beobachtet wurde. Zur Kontrolle wurden log-Zellen aus einer NB-Kultur auf Hexadecan-Minimalagar ausplattiert. Es wuchsen genauso viele Kolonien wie auf NB-Platten; d.h. alle Zellen waren in der Lage, Hexadecan zu verwerten. Der Übergang zur schnellen Wachstumsphase ist daher auf die Bildung von Emulgatoren [43,86,87,119,120,121] oder die Induktion eines zweiten Enzymsystems zurückzuführen [105,106].

Wegen der langen Inkubationszeit wurde während der schnellen Wachstumsphase zweimal Hexadecan nachgefüttert. Die Substratzugabe führte nicht, wie beim Wachstum von A.faecalis AS 72 mit Octan (siehe Abb.14, S.47), zu einer längeren Stagnation der Trübungszunahme, sondern nur zu einer geringfügigen Verlangsamung der Wachstumsrate. Unmittelbar nach der Substratzugabe nahm die Trübung vorübergehend ab. Während der schnellen Wachstumsphase sank der pH-Wert von 7,0 auf 4,9. Die maximale Trübung betrug $OD_{546} = 13,8$, das Trockengewicht 6,9 g/l.

3.2.3. Wachstum mit dampfförmig zugeführten Kohlenwasserstoffen

Für die Fermenteranzucht von Bakterien mit N a p h t h a l i n wurde die in III.3.1.2. (S.49) beschriebene Technik der dampfförmigen Substratzufuhr verwendet. Die in der Zu- und Abluft enthaltene Naphthalinmenge wurde mit der in II.8. (S.15) beschriebenen Kartuschentechnik bestimmt.

P.stutzeri AS 39 wurde im Fermenter bei einer Strömungsrate von 7,8 mg Naphthalin pro h in Minimalmedium angezogen. Der zeitliche Verlauf des Bakterienwachstums und der Naphthalinabnahme ist in Abb.26 dargestellt. Im ersten Versuch wurde die Nährlösung vor dem Beimpfen

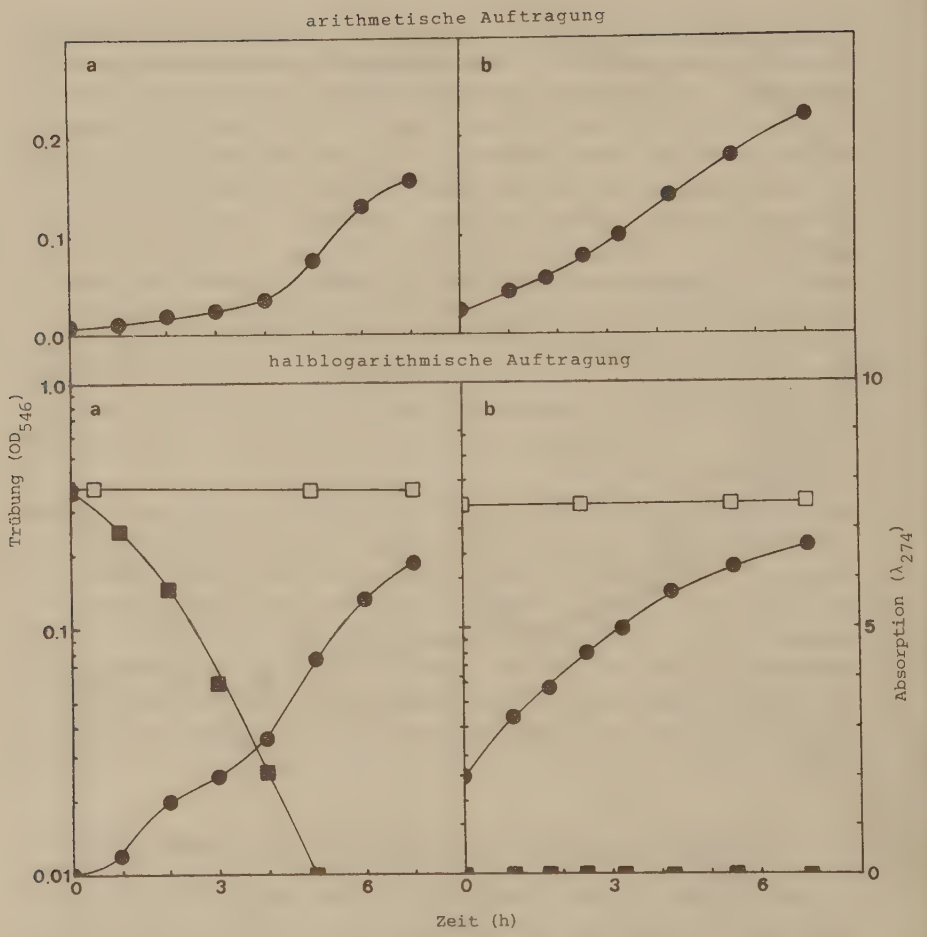


Abb.26: Wachstum von P.stutzeri AS 39 mit dampfförmig zugeführtem Naphthalin

Bakterien aus einer Naphthalin-Vorkultur wurden in einer Nährlösung mit Naphthalin (7,8 mg/h) angezogen (siehe II.6. und 7.2., S.12,14). Die Naphthalinabnahme in der Abluft wurde photometrisch bestimmt (siehe II.8., S.15). In a) wurde die Nährlösung vor dem Beimpfen mit Naphthalin gesättigt, in b) nicht, die Kultur wurde mit soviel Bakterien beimpft, daß kein Substratüberschuß zu erwarten war. Das Trockengewicht wurde nicht bestimmt. Generationszeit 1,2 h.

□ Absorption in der Zuluft
■ Absorption in der Abluft
● Trübung (OD_{546})

mit Naphthalin gesättigt (s.Abb.26a). Die von einer Naphthalin-Platte stammenden Bakterien wurden zugegeben, nachdem die Naphthalin-Strömungsrate in der Fermenterabluft konstant war. Die Wachstumskurve läßt keine eindeutige Aussage über exponentielles oder nicht-exponentielles Wachstum zu. Die Geschwindigkeit der Naphthalinabnahme nimmt stetig zu.

Im zweiten Versuch sollte die Naphthalinzufuhrrate von Anfang an limitierend sein. Die Nährlösung wurde deshalb zu Beginn nicht mit Naphthalin gesättigt und mit soviel Bakterien aus einer Naphthalin-Vorkultur beimpft, daß kein Substratüberschuß mehr vorhanden sein konnte. Tatsächlich wurde von Anfang an im Ausgangsstrom kein Naphthalin gemessen (s.Abb.26b). Die Zellzunahme verlief, wie erwartet, nahezu linear. Der pH-Wert blieb in beiden Versuchen konstant. Wie in III.4.3.1. (S.84) gezeigt wird, läßt sich durch lineares Wachstum mit dampfförmigem Naphthalin mindestens eine Zelldichte von $OD_{546} = 1$ gewinnen.

3.3. Zusammenfassung der versuchstechnischen und physiologischen Bedingungen für die Untersuchung der bakteriellen Tetralinoxidation

1. Bei der Anzucht von Bakterien mit Kohlenwasserstoffen als Kohlenstoff- und Energiequelle waren besondere versuchstechnische Probleme zu berücksichtigen. Die aus der geringen Wasserlöslichkeit der Kohlenwasserstoffe folgende Heterogenität der Nährlösung erschwerte die Beurteilung des Wachstumsverlaufs und der Substratverwertung mit dem herkömmlichen Meßverfahren. Wegen der Verflüchtigung der Substrate - eine Folge des relativ hohen Dampfdrucks der Kohlenwasserstoffe und der Belüftung des Fermenters mit Preßluft - konnte die von den Bakterien verbrauchte Substratmenge und der Ertragskoeffizient nicht ermittelt werden, wenn die Kohlenwasserstoffe als Flüssigkeit bzw. als Feststoff zugeführt wurden. Dies war erst möglich, wenn die Substrate dampfförmig über die Zuluft zugeführt wurden. Auf diese Weise wurden auch die Probleme umgangen, die von emulgierten bzw. suspendierten Kohlenwasserstoffen verursacht worden waren.

2. Starke Schaumbildung der im Fermenter wachsenden Bakterien verhinderte die Anzucht ausreichender Zellmengen sowie die Bestimmung der Substratabnahme. Zur Schaumbekämpfung wurde deshalb ein mechanischer Entschäumer entwickelt.

3. Bei Wachstumsversuchen mit A.faecalis AS 72 wurde der Einfluß der Octan-Anfangskonzentration auf den Zellertrag unter Berücksichtigung verschiedener Belüftungsraten untersucht. P.aeruginosa AS 47 wuchs mit Hexadecan, nicht aber mit Octan, wenn diese Substrate der Kultur flüssig zugesetzt wurden; Octan wurde nur als Kohlenstoff- und Energiequelle verwertet, wenn es als Dampf zugeführt wurde. Mit dampfförmig zugeführtem Naphthalin wurden P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47 angezogen; dabei war die Substratzufuhrrate teilweise wachstumslimitierend.

4. Die lag-Phasen vor dem Einsetzen der Alkan- bzw. Arenverwertung durch die verwendeten Bakterienstämme zeigten, daß mindestens ein Enzym des jeweiligen Abbauwegs nicht konstitutiv ist. Für die Tetralinoxidation muß dieses vorher induziert werden, wenn Tetralin nicht selbst als Induktor fungiert.

4. Tetralin als Substrat für Kohlenwasserstoffe verwertende Bakterien

Unter den neu isolierten Bakterienstämmen befanden sich Heptan-, Octan-, Hexadecan-, Naphthalin- und Campherverwerter. Diese Stämme können folglich mit ihren Monooxygenasen Alkane (P.aeruginosa AS 47, A.faecalis AS 72) oder Terpene (P.stutzeri AS 70) bzw. mit ihren Dioxygenasen Arene (P.aeruginosa AS 47, P.putida AS 39) oxidieren [39,70]. Durch Cooxidationsversuche sollte untersucht werden, ob auch Tetralin von diesen Enzymen oxidiert wird. Cooxidationsversuche werden mit Ruhezellen, in Abwesenheit des Wachstumssubstrats, oder in Gegenwart des Wachstumssubstrats mit wachsenden Zellen durchgeführt [78].

Die mit den beiden Techniken erzielten Ergebnisse können sehr verschieden sein. Deshalb sollten sie, wie im folgenden beschrieben, dazu dienen, den bakteriellen Abbau von Tetralin aufzuklären. Zuvor mußte jedoch untersucht werden, welchen Einfluß Tetralin und mög-

licherweise gebildete Oxidationsprodukte, wie Tetralol-1 und Tetralon-1, auf Bakterien ausüben. Eine Verwertung des Substrats wäre nicht zu erwarten, wenn die Bakterienzellen durch diese Metaboliten geschädigt würden.

4.1. Einfluß von Tetralin und Tetralinoxidationsprodukten auf Kohlenwasserstoffe verwertende Bakterien

4.1.1. Bestimmung der Lebendzellzahl in Gegenwart von verschiedenen Tetralinkonzentrationen

Erfolgreiche Cooxidationsversuche waren nur mit Tetralin tolerierenden Bakterienstämmen denkbar. Als besonders geeignet erschienen daher die Stämme P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47, weil sie in Gegenwart von flüssigem Tetralin isoliert wurden; der Octan verwertende Stamm A.faecalis AS 72 wurde unter schonenderen Bedingungen isoliert (siehe III.2.2., S.38). Deshalb wurde im folgenden untersucht, ob auch dieser Bakterienstamm flüssiges Tetralin toleriert.

Die Wirkung von flüssigem Tetralin auf wachsende Zellen von A.faecalis AS 72 wurde durch Bestimmung der Lebendzellzahl geprüft. Dazu wurden mit Octandampf angezogene Bakterien (siehe II.6. und 7., S.12,14) in 4 Schikanenkolben mit frischer Nährlösung überimpft; der Keimtiter betrug 3 bis 4×10^7 Kolonien/ml; 3 Kulturen wurden weiter mit Octandampf, 1 ohne Kohlenstoffquelle inkubiert. Nach 5 Stunden wurde 2 der mit Octan gewachsenen Kulturen flüssiges Tetralin (5 und 10 mM) zugesetzt. Während der folgenden Inkubationszeit wurden nach 5 Minuten sowie 4,5 Stunden lang in halbstündigen Intervallen und schließlich nach 21 Stunden Proben für die Lebendzellzahlbestimmung entnommen. Der Keimtiter wurde durch Plattieren auf Octan-Platten bestimmt (siehe II.9., S.15).

Nach Zugabe von Tetralin verringerte sich der Keimtiter innerhalb von 5 Minuten drastisch um 76 bzw. 71%, d.h. von $8,5 \times 10^7$ auf 2×10^7 Kolonien pro ml (5 mM Tetralin) bzw. von $1,1 \times 10^8$ auf $3,2 \times 10^7$ Kolonien pro ml (10 mM Tetralin). 30 Minuten nach der Tetralinzugabe war der Keimtiter jedoch schon wieder auf $3,3 \times 10^7$ bzw. 7×10^7

Kolonien pro ml angestiegen (siehe Abb.27, S.73). Nach etwa zweistündiger Stagnation nahm die Lebendzellzahl in der Kultur mit 10 mM Tetralin exponentiell zu und erreichte 4,5 Stunden nach Tetralinzugabe etwa denselben Wert wie die nur mit Octan gewachsene Kultur. In dem Versuchsansatz, der 5 mM Tetralin enthielt, schwankte der Keimtiter während der ersten 4 Stunden beträchtlich und stieg anschließend ebenfalls stark an. Die nächsten Proben wurden 16,5 Stunden später genommen. Während der Zelltiter in allen mit Octan inkubierten Kulturen 3 bis 4×10^9 Zellen pro ml erreichte, hatte zu diesem Zeitpunkt nur die Octankultur ohne Tetralin einen entsprechenden K e i m t i t e r. Die Keimtiter der Kulturen, die in Gegenwart von 5 bzw. 10 mM Tetralin gewachsen waren, lagen etwa eine Zehnerpotenz tiefer und waren nahezu identisch.

Der pH-Wert sank während des Versuchs von 7,40 auf 7,00 (ohne Tetralin) und 6,60 bzw. 6,55 (5 mM bzw. 10 mM Tetralin). Im Kontrollansatz ohne Octan blieben der pH-Wert und der Keimtiter konstant.

Die Tetralinzugabe hatte starke Klumpenbildung zur Folge. Bei der höheren Tetralinkonzentration hatten sich bereits nach 5 Minuten, bei der niedrigeren erst nach 30 Minuten große Agglomerate aus Zellen und Tetralintröpfchen gebildet. Nach 1 Stunde wurden sie bei 10 mM Tetralin bereits wieder kleiner; in der anderen Kultur nahm die Klumpenbildung indessen noch weiter zu. Erst nach ca. 2,5 Stunden waren die Klumpen in beiden Kulturen etwa gleich klein.

Durch die geschilderten Vorgänge wird verständlich, weshalb die Schwankungen des Keimtiters bei der Kultur mit der niedrigeren Tetralinkonzentration größer waren und weshalb nach 2,5 Stunden der Verlauf der Kurven beider Tetralinkulturen einheitlicher wurde. Da beim Wachstum mit Octan in Abwesenheit von Tetralin ebenso wie in Gegenwart zweier verschiedener Tetralinkonzentrationen jeweils dieselbe Gesamtzellzahl erreicht wurde, kann angenommen werden, daß Tetralin für w a c h s e n d e Zellen von A.faecalis AS 72 nicht bakterizid ist. Infolge der Zugabe als Flüssigkeit tritt lediglich eine vorübergehende Hemmung des Wachstums auf.

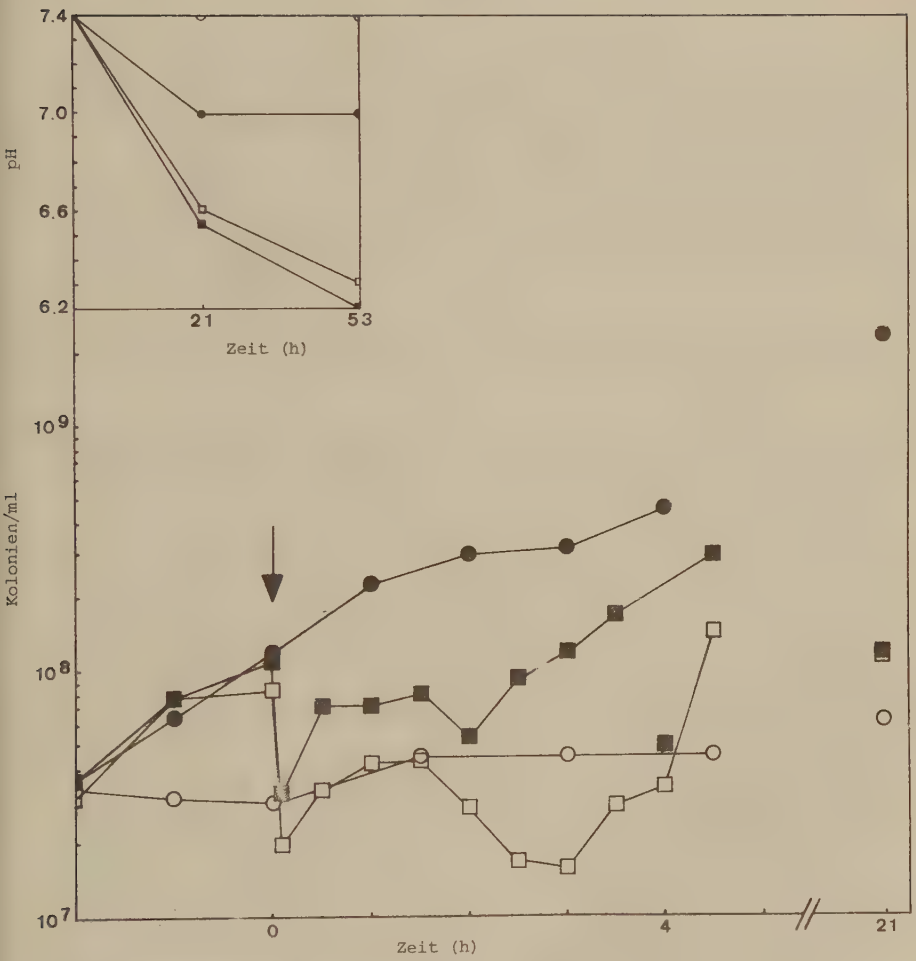


Abb.27: Wachstum von A.faecalis AS 72 mit Octan in Gegenwart von flüssigem Tetralin

Bakterien wurden in 3 Schikanenkolben mit dampfförmigem Octan angezogen (siehe II.6. und 7.2., S.12,14). Der Einfluß von flüssig zugesetztem Tetralin auf die Lebendzellzahl (siehe II.9., S.15) wurde nach Zugabe von 5 mM bzw. 10 mM Tetralin verfolgt. Der pH-Wert der Kulturen, einschließlich einer Kultur, die keine Kohlenstoffquelle enthielt, wurde am Anfang und am Ende der Lebendzellzahlbestimmung sowie 32 Stunden danach gemessen. - Die Z e l l titer der 3 gewachsenen Kulturen lagen nach 21 Stunden zwischen3 und 4×10^9 Zellen pro ml.

o ohne Octan
● mit Octan
□ mit Octan und Tetralin (5 mM)
■ mit Octan und Tetralin (10 mM)

Während des Wachstums von A.faecalis AS 72 mit Octan wurde eine Säure in die Kulturflüssigkeit ausgeschieden. In Gegenwart von Tetralin war die Säurebildung stärker, da der pH-Wert wesentlich weiter absank. Es wäre auch denkbar, daß durch den Abbau von Tetralin ein saurer Metabolit entstünde. Falls dieser stärker bakterizid wirkte als Tetralin selbst, könnte dies die Ursache für den niedrigen Keimtiter der Tetralinkulturen bei Versuchsende sein.

4.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl in Gegenwart von Tetralol-1 und Tetralon-1

Als Produkte der Cooxidation von Tetralin durch Aspergillus niger NCIM 612 fanden Ganapathy et al.[31] Tetralol-1 und Tetralon-1. Die antimikrobielle Wirkung von Alkoholen auf Mikroorganismen ist bekannt[40,85,89]. Die Möglichkeit einer effizienten mikrobiellen Tetralol-1-Gewinnung hing daher wesentlich von der Toleranz der verwendeten Bakterien gegenüber den erwarteten Produkten ab. Im folgenden sollte deshalb die antibakterielle Wirkung von Tetralol-1 und Tetralon-1 untersucht werden. Dazu wurde P.aeruginosa AS 47 ausgewählt, weil dieser Stamm - als Alkan- u n d Arenverwerter - für die Untersuchung des Tetralinabbaus als besonders geeignet erschien.

P.aeruginosa AS 47 wurde mit Hexadecan angezogen (siehe II.6., S.12) und in 5 Schikanenkolben mit frischer Nährlösung überimpft. Die Kulturen wurden bei 30°C mit Tetralol-1 und Tetralon-1, jeweils 5 und 10 mM (in jedem Fall war ein Teil des Hemmstoffs n i c h t gelöst), bzw. ohne Hemmstoff inkubiert. Die Lebendzellzahl wurde durch Plattieren auf NB-Platten bestimmt (siehe II.9., S.15).

Der Verlauf des Keimtiters in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ist in Abb.28 wiedergegeben. Beide Tetralinoxidationsprodukte wirken bakterizid. Aus dem Verlauf der Abtötungskurven geht die Toxizität von Tetralol-1 und Tetralon-1 hervor. Nur bei Tetralon-1 ist eine Abhängigkeit von der Konzentration (gelöstes plus nicht gelöstes Tetralon-1) zu erkennen. Die Abtötungsrate von Tetralol-1 liegt zwischen den Abtötungsraten von 5 und 10 mM Tetralon-1.

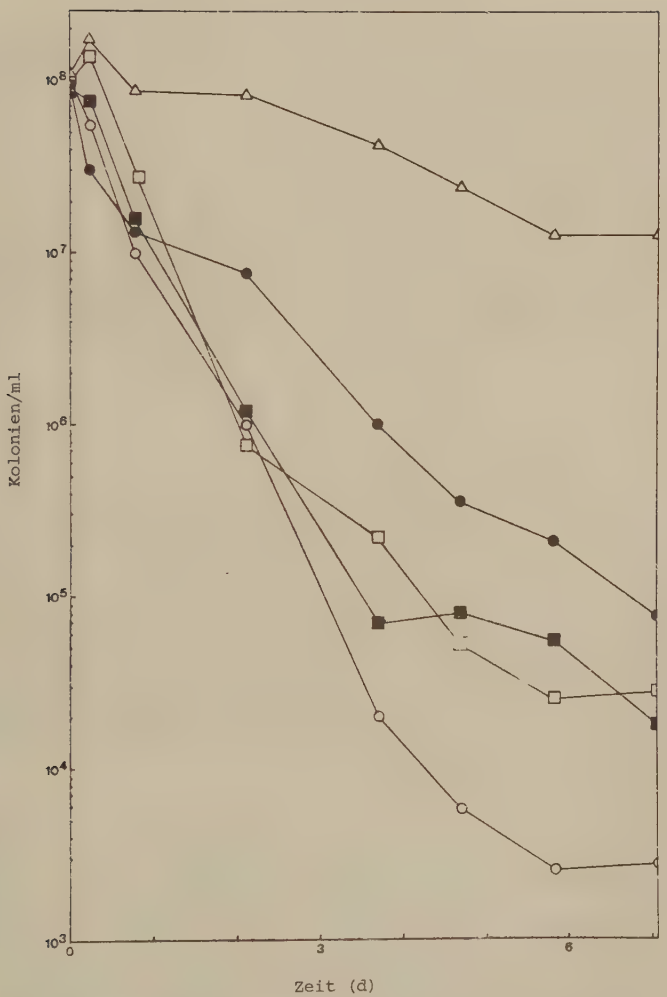


Abb.28: Bestimmung der Lebendzellzahl von P.aeruginosa AS 47 in Gegenwart von Tetralol-1 und Tetralon-1

Mit Hexadecan angezogene Zellen von P.aeruginosa AS 47 wurden in Nährlösung mit Tetralol-1 und Tetralon-1 inkubiert (siehe II.6., S.12). Die Keimtiter wurden aus der Lebendzellzahl auf NB-Platten ermittelt (siehe II.9., S.15).

■ 5 mM Tetralol-1
□ 10 mM Tetralol-1
Δ Kontrolle ohne Hemmstoff
● 5 mM Tetralon-1
○ 10 mM Tetralon-1

Tetralol-1 ist besser in Wasser löslich als Tetralon-1. Unter der Voraussetzung, daß die bakterizide Wirkung durch die Aufnahme von g e l ö s t e m Tetralol-1 bzw. Tetralon-1 ausgelöst wird, gilt daher: Beim Einsatz von Tetralol-1 überschreitet bereits die tatsächlich gelöste Substratkonzentration die Toxizitätsgrenze. Die Erhöhung der Konzentration (gelöstes plus nicht gelöstes Tetralol-1) bleibt daher wirkungslos. Dagegen wird vermutlich bei Tetralon-1 die Aufnahme des Substrats bestimmt von der Geschwindigkeit des Lösungsprozesses und der Diffusion der Tetralon-1-Moleküle aus der organischen Phase zur Zelle. Die Aufnahmerate ist daher von der Gesamtoberfläche an nicht gelöstem Tetralon-1 abhängig [21].

4.1.3. Wachstumsversuch mit Tetralin als alleiniger Kohlenstoffquelle

Bei den Versuchen zur Zellmassegewinnung mit aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen hatte sich gezeigt, daß Octan von P.aeruginosa AS 47 nur als Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet wird, wenn es der Bakterienkultur als Dampf zugeführt wird. Durch diese Methode werden die Kohlenwasserstoffkonzentrationen klein gehalten und antibakterielle Einflüsse möglicherweise verhindert. In III. 4.1.1. wurde außerdem gezeigt, daß f l ü s s i g e s Tetralin das Wachstum von Bakterien mit Octan als Kohlenstoffquelle hemmt. Daher wurde im folgenden untersucht, ob die für die Tetralinverwertung infrage kommenden Bakterienstämme mit d a m p f f ö r m i g zugeführtem Tetralin wachsen können.

Die Bakterienstämme wurden mit dampfförmigem Naphthalin (P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47), Octan (P.aeruginosa AS 47) und Campher (P.stutzeri AS 70) in Blasensäulen angezogen (siehe II.6., S.12). Dadurch sollte Wachstum mit Tetralin auch dann möglich sein, wenn Tetralin durch die Enzyme der jeweiligen Abbauwege zwar umgesetzt, die Enzymsynthese von Tetralin aber nicht induziert werden kann.

Die mit den Induktoren Naphthalin, Octan und Campher angezogenen Bakterien wurden in der exponentiellen Phase geerntet und in Blasensäulen mit frischer Nährlösung (200 ml) überimpft. Die Kulturen wurden 21 Tage mit Tetralindampf (4,7 mg/h) inkubiert. Durch die Bestimmung der Keimzahl auf NB-Platten wurde das Verhalten der Kulturen verfolgt (s.Abb.29). Als Kontrolle wurden die entsprechenden Zellsuspensionen ohne Kohlenstoffquelle im Schikanenkolben inkubiert.

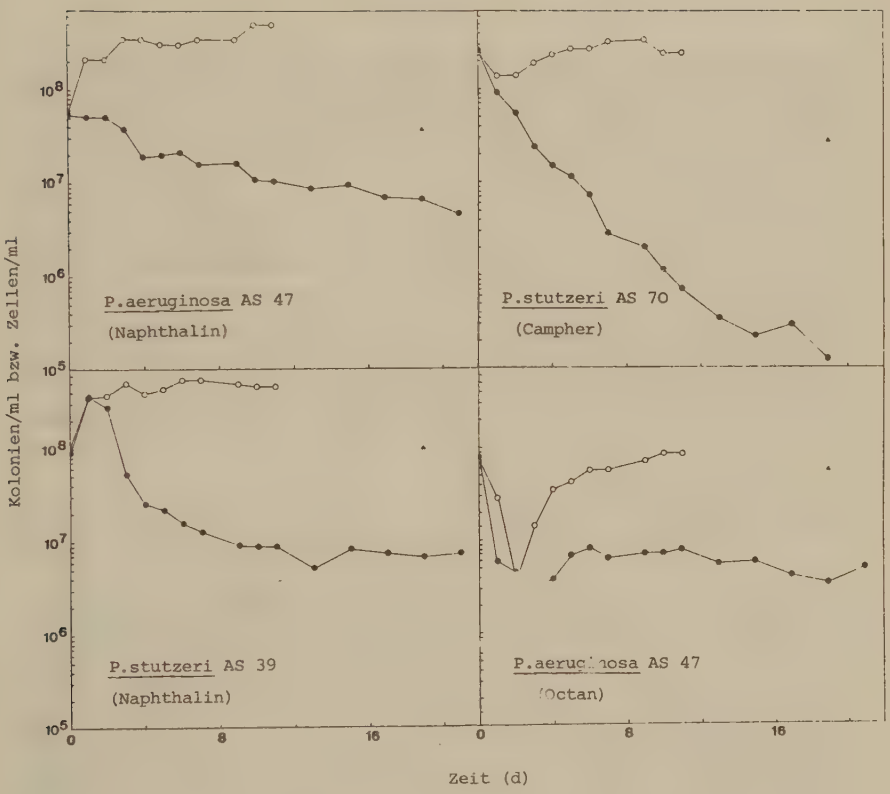


Abb.29: Wachstumsversuch mit dampfförmig zugeführtem Tetralin als alleiniger Kohlenstoffquelle

Bakterien wurden mit den Induktoren ihrer jeweiligen Abbauwege angezogen und in der Blasensäule mit Tetralindampf (4,7 mg/h) inkubiert. Das Verhalten der Bakterien wurde durch Zell- und Keimtiterbestimmung (auf NB-Platten) verfolgt (siehe II.9.,S.15); gegenläufige Tendenzen beider Parameter sind auf starke Schaumbildung zurückzuführen. In den Kontrollansätzen ohne Tetralin wurde durch Zelltiterbestimmung kein Wachstum festgestellt. Die Kultur von P.stutzeri AS 39 färbte sich schon innerhalb des ersten Tages braun bis violett; die von P.aeruginosa AS 47 (Anzucht Naphthalin) verfärbte sich langsam braun.

● Keimtiter o Zelltiter ▲ Keimtiter der Kontrollen ohne Tetralin

Die Auswertung des Versuchs wurde durch die Schaumentwicklung beeinträchtigt. Bei P.stutzeri AS 39 wurde nach 24 h eine Zunahme der Keimzahl um den Faktor 3,9 und der Gesamtzellzahl um den Faktor 3,4 ermittelt. Berücksichtigt man die starke Schaumentwicklung, die viele Bakterienzellen aus der Suspension verdrängt hatte, so könnten 3 oder mehr Generationen durchlaufen worden sein. Eine Verwertung von Naphthalin, das möglicherweise noch in den Zellen gespeichert war, kann nicht zum Zellwachstum geführt haben, da in der Vergleichskultur ohne Tetralin keine Zellzunahme stattfand. Nach 2 bis 3 Tagen färbte sich die Kultur allmählich braun, während im Schaum violett gefärbte Zellklumpen zu erkennen waren. Nach 2 Tagen nahm die Keimzahl deutlich ab. Daraus kann geschlossen werden, daß P.stutzeri AS 39 beim Abbau von Tetralin einen bakteriziden Metaboliten bildete oder daß ein gebildeter Metabolit durch Autokatalyse im Medium zum bakteriziden Produkt reagiert.

Die mit Naphthalin angezogenen Zellen von P.aeruginosa AS 47 schäumten zu Beginn der Tetralininkubation wesentlich stärker als die mit Octan angezogenen Zellen. Die Gesamtzellzahl nahm in den ersten 24 Stunden um den Faktor 3,75 zu, die Keimzahl blieb konstant. Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, daß in dieser Zeit relativ viele keimfähige Zellen in die Schaumschicht gelangten. Die Zellzunahme muß auch hier auf eine Verwertung von Tetralin zurückzuführen sein, da im Kontrollansatz nach 19 Tagen nur eine Verdopplung der Gesamtzellzahl beobachtet wurde. Der Keimtiter lag hier um den Faktor 5 höher als bei der Tetralinkultur. Die vom dritten Tag an beobachtete Abtötung in Gegenwart von Tetralin verlief wie bei P.stutzeri AS 39; langsamer als bei diesem Stamm trat auch hier eine Braunfärbung des Mediums auf.

Wurde P.aeruginosa AS 47 mit Octan angezogen, so fand bereits in den ersten 24 Stunden der Tetralininkubation eine Abnahme der Keimzahl um 92% statt; im Kontrollansatz wurde in 19 Tagen nur eine Abnahme der Keimzahl um 31% beobachtet. Auch hier wurden viele Bakterien während der ersten 2 Tage in den Schaum verdrängt, wie aus der Gesamtzellzahlkurve zu ersehen ist. Die Abtötung war stärker ausgeprägt als bei den mit Naphthalin angezogenen Zellen und setzte früher ein. Eine Verfärbung des Mediums trat nicht auf.

Auf den Campherverwerter P.stutzeri AS 70 wirkte Tetralin stark bakterizid. Die halblogarithmische Auftragung des Keimtiters ergab eine nahezu lineare Abtötungskurve. Nach 19 Tagen enthielt die Tetralinkultur nur noch 0,3%, der Kontrollansatz dagegen 7,3% Überlebende.

Der Versuch wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt, um zu prüfen, ob in dieser Zeit durch Tetralin die Synthese weiterer Enzyme, die zum Tetralinabbau geeignet sind, induziert wird. Eine weitere Zunahme der Gesamtzellzahl wurde jedoch nicht beobachtet; der Keimtiter nahm fortwährend ab. Falls durch Tetralin besondere Enzyme induziert wurden, wären diese höchstens für die Entstehung bakterizider Metabolite verantwortlich zu machen.

4.2. Tetralin als Cosubstrat für Alkane verwertende Bakterien

4.2.1. Versuche zur Tetralinoxidation durch Ruhezellen

Die ersten Vorversuche zur Cooxidation von Tetralin wurden mit nicht wachsenden, sogenannten Ruhezellen von P.aeruginosa AS 47 und A.faecalis AS 72, bei relativ hohen Zelldichten (OD_{546} = 4 bis 14) durchgeführt. Diese Methode eignet sich besonders dann zum Nachweis von Metaboliten, wenn das Cosubstrat (z.B. Tetralin) oder ein Folgeprodukt auf einer bestimmten Stufe des z.B. durch Heptan induzierten Abbauwegs im Vergleich zum natürlichen Substrat nur verlangsamt oder gar nicht weiter umgesetzt wird. Der entsprechende Metabolit wird dann angereichert und ggf. in die Nährlösung ausgeschieden[16,90].

Zellen von P.aeruginosa AS 47 und A.faecalis AS 72 wurden mit 40 mM Hexadecan bzw. 20 mM Heptan im Schikanenkolben angezogen (siehe II.6., S.12), geerntet und im Erlenmeyerkolben mit Hilfe eines Magnetrührers resuspendiert. Die Ruhezellen wurden 3 bis 5 Stunden in der Nährlösung ohne Kohlenstoffquelle gerührt, damit eventuell gespeicherte Kohlenwasserstoffreste veratmet werden konnten und anschließend mit Tetralin (10 bis 100 mM) 2 bis 4 Stunden inkubiert. Die Isolierung von Metaboliten erfolgte durch Extraktion mit Ether (siehe II.10., S.16). Die Kulturextrakte wurden entsprechend einer Methode von Pelz[75] gaschromatographisch analysiert (siehe III.1.1., S.22).

Tab.9: Versuche zur Cooxidation von Tetralin durch Ruhezellen von A.faecalis AS 72 [a)]

Wachstumssubstrat [mM]		Tetralin [mM]	Trübung OD_{546}	Versuchszeit [n]
Heptan	80	50	5,3	10
	20	10	13,3	10
	20	10	4,0	4
	20	10	11,8	2
	20	100	14,8	4
	20	100	12,0	4
Octan	20	33	2,5	3,5
	20	13	2,0	14,5
	20	13	1,6	11

[a)] Produktnachweis s. Text und III.1., S.19ff.

Die Versuchsbedingungen von 6 Cooxidationsversuchen sind in Tab.9 zusammengefaßt. Die Verläßlichkeit des Produktnachweises wurde durch Kontrollversuche in Frage gestellt (siehe III.1., S.19ff). Beim Einengen der Kulturextrakte wurde ein unbestimmter Anteil des Tetralins verflüchtigt, so daß eine Bilanzierung des Umsatzes nicht durchgeführt werden konnte. Ein Ersatz für dieses unbefriedigende Verfahren wurde, wie in III.1.2. (S.25) beschrieben, in der Extraktion durch Kartuschen gefunden. Damit wurde eine bessere Reproduzierbarkeit erreicht. Außerdem konnten die Probenvolumina und die Aufarbeitungszeit bei der Erstellung von Umsatzkinetiken verringert werden.

In 3 Versuchen wurden mit Octan wachsende Zellen von A.faecalis AS 72 in der Mitte oder am Ende der exponentiellen Wachstumsphase mit 13 oder 33 mM Tetralin (flüssig) inkubiert (s.Tab.9). Vor der Tetralinzugabe sowie danach, nämlich nach 1, 15, 30, 60 Minuten, 2, 4, 6, 8 und 14 Stunden, wurden 25 ml als Probe entnommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der in II.10., S.16 beschriebenen Kartuschentechnik aufgearbeitet und gaschromatographisch analysiert (siehe II.11., S.17). Dabei wurden keine Produktpeaks nachgewiesen. Eine signifikante Tetralinabnahme fand nicht statt.

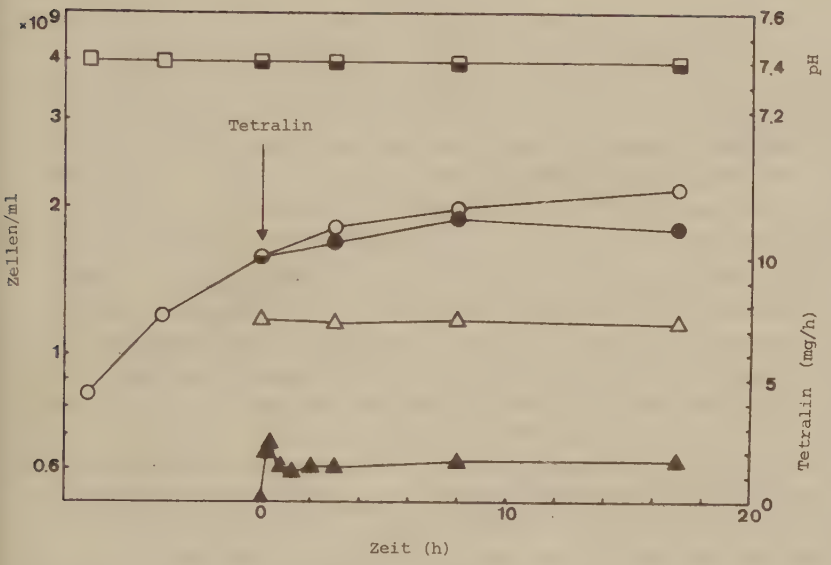


Abb.30: Versuch zur Cooxidation von Tetralin durch Octan verwertende Zellen von P.aeruginosa AS 47

Bakterien wurden im Fermenter mit dampfförmig zugeführtem Octan (264 mg/h) angezogen (siehe II.6. und 7.2., S.12,14) und auf 2 Fermentergefäße verteilt. Eine Kultur wurde weiter mit dampfförmigem Octan, die andere mit Tetralin (7,4 mg/h) inkubiert. Die Tetralinkultur enthielt noch gelöstes Octan. Die Tetralin-Strömungsrate wurde im Strömungssystem bestimmt (siehe II.8., S.15). Mit dem in II.10. und 11. sowie III.1 (S.16,17,22) beschriebenen Verfahren wurden keine Tetralinoxidationsprodukte nachgewiesen, in Gegenwart von Tetralin war Octanol-1, nur qualitativ aufgrund der Retentionszeit, nachweisbar.

o Zelltiter mit Octan Δ Tetralinströmungsrate in der Zuluft □ pH mit Octan
● Zelltiter mit Tetralin ▲ Tetralinströmungsrate in der Abluft ■ pH mit Tetralin

4.2.2. Versuche zur Tetralinoxidation durch wachsende Zellen

P.aeruginosa AS 47 wurde mit dampfförmig zugeführtem Octan (264 mg/h) im Fermenter angezogen (siehe II.6. und 7.2., S.12,14). Bei einem Zelltiter von $1,6 \times 10^9$ Zellen/ml wurde die Kultur auf 2 Fermentergefäße verteilt. Eine Kultur wurde weiter mit Octan, die andere mit dampfförmigem Tetralin (7,4 mg/h) inkubiert. Da die Octanzufuhr bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht limitierend war - in der Abluft war starker Octangeruch wahrzunehmen, war nach dem Aufteilen der

Kultur weiteres Wachstum auch in der Tetralinkultur zu erwarten. Tetralin wurde mit nur geringer Strömungsrate, d a m p f f ö r m i g und nicht flüssig, in hoher Konzentration, zugesetzt, wie in den vorangegangenen Versuchen. Der Kulturüberstand wurde nach 1, 3, 7,5 und 17 Stunden mit Hilfe der in II.10., 11.1. und III.1. (S.16f und 19) beschriebenen Methoden auf Tetralol-1, Tetralon-1 und andere Tetralinoxidationsprodukte sowie Octanal und Octanol-1 untersucht.

Aus Abb.30 ist zu ersehen, daß das Wachstum in Gegenwart von Tetralin langsamer verlief und dann, vermutlich nach dem Verbrauch des restlichen Octans, stagnierte. Tetralinoxidationsprodukte wurden nicht nachgewiesen, obwohl in der Abluft ein Tetralinverbrauch von 5,8 bis 6,1 mg/h festgestellt wurde. Der pH-Wert der Tetralinkultur und der Octankultur blieben konstant. Für den Verbleib des Tetralins sind mehrere Erklärungen denkbar: Entweder wurde Tetralin in nicht nachgewiesene Produkte transformiert, oder Tetralin wurde von den Bakterien adsorbiert und/oder gespeichert [92]. Ein nicht quantifizierbarer Peak mit der Retentionszeit von Octanol-1 trat in Gegenwart von Tetralin auf. Der Frage, ob Octanol-1 bei der Verwertung von Octan durch P.aeruginosa AS 47 auftritt, wurde in einem weiteren Versuch nachgegangen.

4.2.3. Nachweis von Octanol-1 als Metabolit der Octanoxidation

Suzuki und Ogawa [103] zeigten, daß Arthrobacter paraffineus KY 4303 beim Wachstum mit Alkanen die korrespondierenden Alkohole in die Nährlösung ausschied. Zur Prüfung der in der vorliegenden Arbeit angewandten Untersuchungsmethoden sollte untersucht werden, ob Octanol-1 als Metabolit des bakteriellen Octanabbaus nachgewiesen werden kann. Im Blick auf die Cooxidation von Tetralin erschien P.aeruginosa AS 47 wegen seines Substratspektrums als besonders interessant. Aus Tab.8 (S.42) geht hervor, daß dieser Stamm sowohl aliphatische als auch aromatische Kohlenwasserstoffe verwerten kann.

Zellen von P.aeruginosa AS 47 wurden in 2 Fermentern mit dampfförmigem Octan angezogen (siehe II.6., S.12). Nach 25 Stunden wurde einer Kultur Borat (Endkonzentration 25 mM) zugesetzt. Durch die Zugabe von Borat, das die Alkoholdehydrogenase hemmt [3], sollte versucht

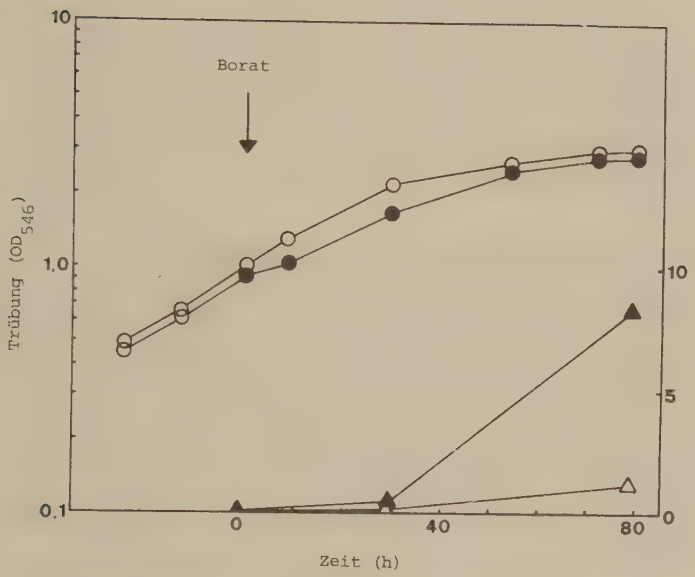


Abb.31: Bildung von Octanol-1 beim Wachstum von P.aeruginosa AS 47 mit Octan

Bakterien wurden in 2 Fermentern mit dampfförmigem Octan (264 mg/h) angezogen (siehe II.6. und 7.2., S.12,14). Die Octanolbildung in Gegenwart von 25 mM Borat und im Kontrollansatz wurde mit der Kartuschentechnik bestimmt (siehe II.10. und 11. sowie III.1.1., S.16,17,22).

o Trübung mit Octan
● Trübung mit Octan in Gegenwart von Borat
Δ Octanol-1
▲ Octanol-1 in Gegenwart von Borat

werden, die Alkoholausscheidung zu verstärken. Die Bildung von Octanol-1 wurde durch Extraktion mit Kartuschen und durch gaschromatographische Analyse nachgewiesen.

Während des Wachstums von P.aeruginosa AS 47 mit Octan wurde nur sehr wenig Octanol-1 in die Nährlösung ausgeschieden (s.Abb.31). Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase bildeten die Zellen jedoch in Gegenwart von Borat wesentlich mehr Octanol-1 als im Vergleichsansatz; am Ende des Versuchs war die Octanolkonzentration 8 mal so groß.

Mit diesem positiven Kontrollversuch wurde bewiesen, daß Metabolite des bakteriellen Kohlenwasserstoffabbaus mit dem zur Verfügung stehenden Analyseverfahren erfaßt werden. Außerdem wurde gezeigt, daß mit einem Inhibitor der Alkoholdehydrogenase die Ausbeute des zugehörigen Reaktionsprodukts (z.B. Octanol-1) erhöht werden kann.

4.3. Tetralin als Cosubstrat für Arene verwertende Bakterien

Für die Untersuchungen zum Abbau von Tetralin über den Arenweg (s. Abb.3 und 5, S.4,7) standen die Bakterienstämme P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47 zur Verfügung. Da beide Stämme mit Naphthalin als Kohlenstoff- und Energiequelle wuchsen, sollten sie prinzipiell auch in der Lage sein, das strukturverwandte Tetralin umzusetzen. Diese Vermutung wurde unterstützt durch den in III.4.1.3., S.76 beschriebenen Wachstumsversuch: Nach der Anzucht mit Naphthalin wuchsen die Bakterien in Gegenwart von Tetralin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle; das Wachstum stagnierte jedoch schon nach 2 bis 3 Generationen; das Medium färbte sich braun, und die Zellen wurden abgetötet. In Anbetracht des langsamen Wachstums von P.aeruginosa AS 47 (Generationszeit für Naphthalin: 3,8 h; siehe S.55) wurden die weiteren Untersuchungen mit P.stutzeri AS 39 (1,2 h; siehe S.68) durchgeführt. Damit sollte gleichzeitig der Anteil von Autoxidationsprodukten klein gehalten werden.

4.3.1. Verwertung von Tetralin in Gegenwart von Naphthalin

P.stutzeri AS 39 wurde im Fermenter mit Naphthalindampf (7,8 mg/h) angezogen (siehe II.6. und 7., S.12,14). In der Abluft wurde während des Wachstums kein Naphthalin nachgewiesen. Nach 33 Stunden, bei einer Zelldichte von $OD_{546} = 1,1$ wurde die Naphthalinzufuhrrate auf 50% reduziert und zusätzlich Tetralindampf (8 mg/h) in den Fermenter eingeleitet. Die Trübung nahm in den darauf folgenden 16 Stunden bis $OD_{546} = 1,8$ zu (s.Abb.32). Dabei wurde Tetralin in der Abluft festgestellt, jedoch nicht quantitativ bestimmt. Wegen der wenigen Meßpunkte konnte nicht zweifelsfrei entschieden werden, ob die Wachstumsrate in dieser Zeit konstant blieb oder geringfügig zunahm.

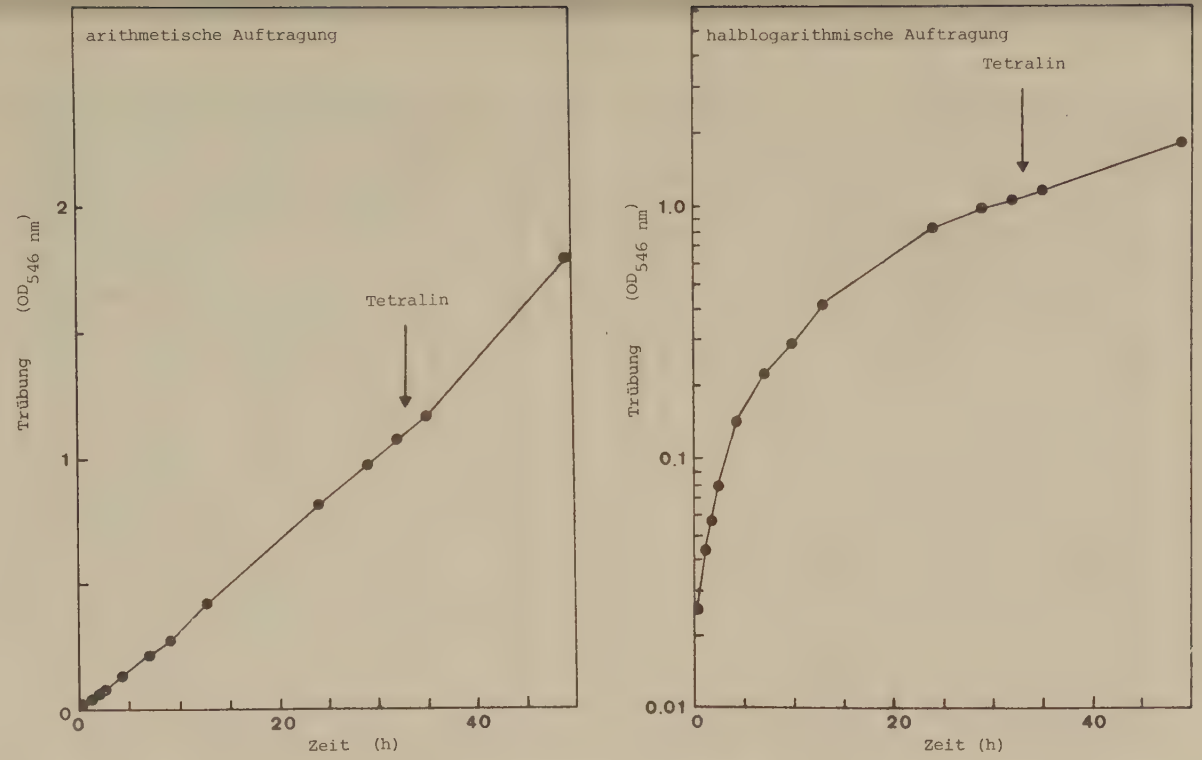


Abb.32: Wachstum von P.stutzeri AS 39 mit dampfförmig zugeführtem Naphthalin

Ohne vorherige Substratsättigung der Nährlösung wurden Bakterien aus einer Naphthalinvorkultur bei konstanter Naphthalinzufuhrrate (7,8 mg/h) vermehrt (siehe II.6. und 7.2., S.12,14). Nach 33 Stunden wurde die Naphthalinzufuhrrate auf 4 mg/h gesenkt und zusätzlich Tetralindampf (8 mg/h) zugeführt.

Da vor der Inkubation mit Tetralin in der Abluft kein Naphthalin enthalten war und die Trübung der Kultur linear zunahm, ist anzunehmen, daß die Naphthalinverwertung vollständig war. Die Massenbilanz ergab sich wie folgt: In 33 Stunden wurden 257 mg Naphthalin durch die Kultur geleitet; die gebildete Zelltrockenmasse betrug 198 mg. Der Ertrag $(Ys)^{102}$ war demnach 77%. Während der folgenden 16 Stunden wurden der Kultur 62 mg Naphthalin und 128 mg Tetralin, d.h. insgesamt 190 mg Substrat zugeführt; währenddessen wurden 89 mg Zelltrockenmasse gebildet. Wäre nur Naphthalin verwertet worden, wäre der Ertrag 144%. Daraus ist zu ersehen, daß Tetralin teilweise in Zellmasse umgesetzt wurde. Da die tatsächlich verbrauchte Tetralinmenge nicht bekannt war, konnte für Naphthalin plus Tetralin kein Ertragskoeffizient berechnet werden.

Vor und nach der Tetralininkubation wurde der Kulturüberstand mit Hilfe der in II.10. und 11. (S.16f) beschriebenen Kartuschentechnik analysiert. Es wurde kein Tetralol-1 und Tetralon-1 nachgewiesen. Ebenso fehlten in den Gaschromatogrammen Peaks, die man einem Tetralindiol hätte zuordnen können.

4.3.2. Nachweis von Tetralol-1 und Tetralon-1 in Gegenwart von Salicylat

Um festzustellen, ob die Enzyme des Naphthalinwegs in P.stutzeri AS 39 Tetralin umsetzen, wurde versucht, die Aufnahme von Tetralin durch die Zellen sowie eine daraus resultierende Produktbildung nachzuweisen. Wie in III.3.1.3. (S.52) gezeigt, wird beim Wachstum mit Salicylat die Synthese der Enzyme für den Naphthalinabbau induziert. Deshalb wurde im folgenden die Produktbildung durch wachsende Zellen nach Zugabe von Salicylat anstelle von Naphthalin bestimmt. Dadurch konnte die Tetralinabnahme in der Abluft unmittelbar nach der Probenahme photometrisch bestimmt werden. Bei der Verwendung von Naphthalin als Wachstumssubstrat wäre eine gaschromatographische Trennung von Tetralin und Naphthalin erforderlich gewesen.

Mit Naphthalin angezogene, mit Phosphatpuffer gewaschene Zellen von P.stutzeri AS 39 wurden in 750 ml Nährlösung im Fermenter mit Tetralindampf inkubiert (siehe II.6. und 7., S.12,14). Die Tetralinzu-

fuhrrate betrug 19,7 ± 2,5 mg/h (0 bis 96 h) bzw. 26,1 ± 0,6 mg/h (96 bis 119 h).

Der Zelltiter blieb 4 Tage nahezu konstant (1,0 bis $1,4 \times 10^8$ Zellen/ml). Daraufhin wurden die Bakterien mit Salicylat (1,5 mM) vermehrt. In Abb.33 ist der zeitliche Verlauf von Zelltiter, Substrat- und Produktkonzentrationen und Tetralingehalt in der Abluft wiedergegeben. Der Tetralinverbrauch wurde graphisch ermittelt (siehe II.8., S.15). In Tab.10 (S.89) sind die für eine Bilanzierung des Tetralinumsatzes erforderlichen Werte zusammengefaßt.

Die nicht wachsenden Zellen von P.stutzeri AS 39 bildeten in 96 Stunden 8,0 mg/l Tetralol-1. Darin ist ein nicht enzymatisch entstandener Anteil - als Folge der Verunreinigung bzw. der Autoxidation des Tetralins - von maximal 1,5 mg/l enthalten (siehe III.1.1., S.22). Die Tetralonkonzentration war 3,4 mg/l, der nicht enzymatisch entstandene Anteil maximal 1,5 mg/l. Die Tetralinaufnahme durch die Zellen war so gering, daß sie nicht bestimmt werden konnte.

Nach der Vermehrung der Zellen von $1,4 \times 10^8$ auf $1,4 \times 10^9$ Zellen/ml wurden im Medium 26,5 mg/l Tetralol-1 und 7,4 mg/l Tetralon-1 nachgewiesen, nicht enzymatisch maximal 2,0 bzw. 1,9 mg/l. Die Tetralol-1-Bildungsrate stieg beim Wachstum von $6,9 \times 10^{-7}$ auf $9,6 \times 10^{-6}$ Mol/l/h, d.h. sie nahm um das 14fache zu. Die Bildungsrate für Tetralon-1 versechsfachte sich in derselben Zeit. Die tatsächlichen maximalen Bildungsraten für die exponentielle Wachstumsphase liegen vermutlich noch darüber. Sie konnten jedoch nicht berechnet werden, da die letzte in Frage kommende Probe erst nach Beendigung der Salicylatverwertung genommen wurde (s.Abb.33).

Vergleicht man die Änderungen der Zell- und Tetralol-1-Bildungsraten in verschiedenen Abschnitten während der ersten 9 Stunden nach der Salicylatzugabe (siehe Tab.10, S.89), so zeigt sich bei der Tetralol-1-Bildungsrate eine wesentlich stärkere Zunahme: Sie vergrößert sich um den Faktor 6,8, während die Zellbildungsrate nur um den Faktor 2,4 zunimmt; d.h. die spezifische Aktivität des Tetralol-1 bildenden Enzyms scheint zuzunehmen. Dabei wäre noch zu berücksichtigen, daß ein Teil des gebildeten Tetralol-1 zu Tetralon-1 umgesetzt wird.

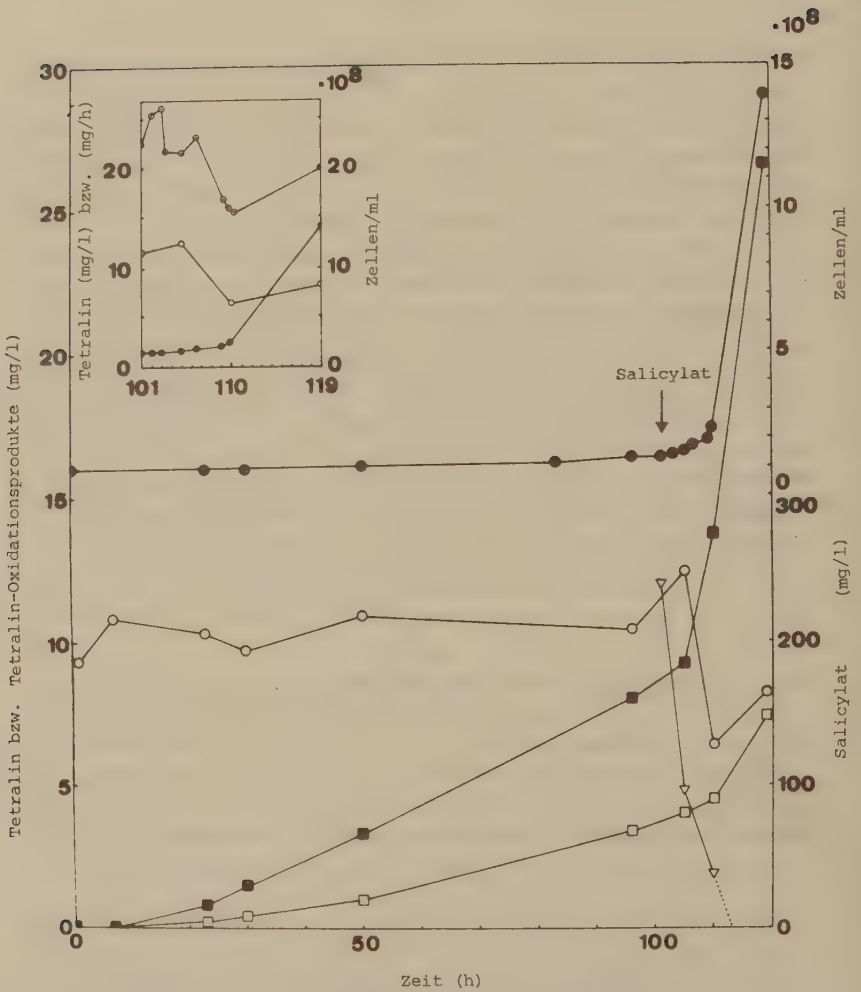


Abb.33: Cooxidation von Tetralin durch P.stutzeri AS 39

Nicht wachsende Zellen von P.stutzeri AS 39 (Naphthalinvorkultur) wurden mit dampfförmig zugeführtem Tetralin (19,7 mg/h) inkubiert (siehe II.7.2., S.14). Nach 101h wurden die Zellen durch Zugabe von Salicylat (1,5 mM) in Gegenwart von Tetralin (26,1 mg/h) vermehrt. Substrat- und Produktkonzentrationen wurden, wie in II.8., 10., 11. (S.15ff) beschrieben, bestimmt. Zwei nicht dargestellte unbekannte Produkte der sauren Fraktion nahmen während des Wachstums ebenfalls signifikant zu.

- ● Zelltiter
- ⊙ Tetralinströmungsrate (Abluft)
- △ Salicylat
- ■ Tetralol-1
- □ Tetralon-1
- ○ Tetralin (gelöst)

Tab.10: Zusammenfassung von Versuchsdaten zum Umsatz von Tetralin durch nicht wachsende, sowie mit Salicylat wachsende Zellen von P.stutzeri AS 39

Substrat bzw. Produkt[a] [mg] \ Zeit [h]	0 - 96	101 - 119	105 - 110	110 - 119
Tetralinzufuhr	1891,2	600,3	-	-
Tetralinverbrauch	n.b.	125,4	33,4	79,8
Salicylatverbrauch	-	110,0	-	-
Kohlenstoffquellen-verbrauch	-	235,4	-	-
Tetralol-1-Bildung	4,4	8,9	2,2	6,3
Tetralon-1-Bildung	1,9	1,8	0,3	1,4

Bildungsrate[b] [Zellen×ml^{-1}×h^{-1}] bzw. [Mole×l^{-1}×h^{-1}] \ Zeit [h]	50 - 96	102 - 105	105 - 110
Zellen	-	$6,7 \times 10^{6}$	$1,6 \times 10^{7}$
Tetralol-1	$6,9 \times 10^{-7}$	$9,0 \times 10^{-7}$	$6,1 \times 10^{-6}$
Tetralon-1	$3,6 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-7}$	$6,8 \times 10^{-7}$

a) Die Daten wurden aus den entsprechenden Kurvenabschnitten in Abb.33 (S.88) ermittelt. Bei der Umrechnung von Konzentrationsangaben in die Gesamtmenge wurde die Verringerung des Fermenter-Füllvolumens infolge der Probenahme berücksichtigt: 710 ml (0 h); 670 (7); 630 (23); 590 (30); 570 (50); 550 (96); 530 (105); 510 (109); 490 (119).

b) Zur Kontrolle wurden die Bildungsraten auch aus dem egalisierten Kurvenverlauf ermittelt. (Die Kurven in Abb.33 sind nicht egalisiert, sondern durch geradlinige Verbindung der einzelnen Punkte entstanden.) Auch so ergab sich eine überproportionale Zunahme der Tetralol-1-Bildungsrate.

n.b. nicht bestimmt

Die Produktausbeuten sind ebenfalls der Tab.10 zu entnehmen. Während des Wachstums mit Salicylat wurde bezogen auf die im Strömungssystem gemessene Tetralinabnahme 6,3% (101 bis 110 Stunden) bzw. 7% (110 bis 119 Stunden) in Tetralol-1 und 1,3 bzw. 1,6% in Tetralon-1 umgesetzt. Nach der Zugabe von Salicylat sank mit beginnendem Bakterienwachstum die Konzentration des gelösten Tetralins in 5 Stunden

von 12,4 auf 6,4 mg/l. Der Tetralinverbrauch im Strömungssystem stieg gleichzeitig von 5,1 auf 10,3 mg/h (s.Abb.33). Es wurden 3,4 mg aus der Nährlösung (530 ml) und 33,4 mg aus dem Strömungssystem, d.h. insgesamt 36,8 mg bzw. $2,8 \times 10^{-4}$ Mole Tetralin 5 Stunden verbraucht. Währenddessen wurden $1,5 \times 10^{-5}$ Mole Tetralol-1 gebildet. Die Tetralol-1-Ausbeute war demnach 5,4%.

Die saure Fraktion der Kulturextrakte (siehe II.10., S.16) enthielt 2 nicht näher charakterisierte Produkte, deren Bildungsrate während des Wachstums um den Faktor 8 bzw. 23 zunahm.

Während der Vermehrung von P.stutzeri AS 39 wurden 235 mg Substrat (125 mg Tetralin und 110 mg Salicylat) umgesetzt. Dabei wurden 203 mg Zelltrockenmasse gebildet. Daraus folgt, daß nicht nur Salicylat, sondern zumindest teilweise auch Tetralin als Kohlenstoff- und Energiequelle verwertet wurde.

4.4. Zusammenfassung der Untersuchungen mit Tetralin als Substrat für Kohlenwasserstoffverwerter

1. Durch die Zugabe von flüssigem Tetralin zu einer mit Octan wachsenden Kultur von A.faecalis AS 72 wurde das Wachstum für 4 Stunden gehemmt; danach wuchsen Bakterien bis zum gleichen Zelltiter wie eine nur mit Octan gewachsene Kultur. Wurde Tetralin d a m p f f ö r m i g zugeführt, vermehrten sich zuvor mit Naphthalin angezogene Zellen von P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47 um mindestens zwei Generationen. Mit Octan bzw. Campher angezogene Zellen von P.aeruginosa AS 47 bzw. P.stutzeri AS 70 wurden in Gegenwart von dampfförmigem Tetralin abgetötet.
2. Die während des Wachstums von A.faecalis AS 72 mit Octan auftretende Säurebildung wurde in Gegenwart von Tetralin verstärkt; dabei wurden die Bakterien abgetötet. Bei der Inkubation von P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47 (Naphthalin-Vorkultur) mit Tetralin entstanden bakterizide Produkte (evtl. durch Autokatalyse).

3. Tetralin wurde durch Ruhezellen von A.faecalis AS 72, nach Anzucht mit Octan, nicht zu Tetralol-1 oder Tetralon-1 transformiert. Mit Octan wachsende Zellen von P.aeruginosa AS 47 transformierten Tetralin nicht. Während des Wachstums dieses Stammes mit Octan wurde Octanol-1 in die Nährlösung ausgeschieden; in Gegenwart von Borat, einem Inhibitor der Alkoholdehydrogenase, wurde die 8fache Octanolkonzentration nachgewiesen.

4. Tetralin wurde durch Zellen von P.stutzeri AS 39, die gleichzeitig mit Naphthalin und Tetralin inkubiert wurden, als Wachstumssubstrat verwertet. Mit Salicylat wachsende Zellen dieses Stammes transformierten dampfförmig zugeführtes Tetralin zu Tetralol-1 und Tetralon-1.

IV. DISKUSSION

Mikroorganismen, die aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten, lassen sich relativ leicht aus dem Erdboden oder aus Gewässern isolieren. Die Fähigkeit, A l k a n e zu assimilieren, ist unter den Mikroorganismen besonders weit verbreitet, wenn auch nicht immer in dem Ausmaß, wie es von den Gattungen Pseudomonas oder Candida bekannt ist[22,80]. Unsubstituierte C y c l o a l k a n e gelten dagegen als besonders resistent gegenüber mikrobiellem Abbau. Nachdem bereits viele Arbeitsgruppen vergeblich versucht haben, mit R e i n k u l t u r e n die Verwertung von Cycloalkanen als Wachstumssubstrat nachzuweisen, resümiert Trudgill in einem Übersichtsaufsatz: "There are areas of study within which progress by this particular approach has been slow and frustating, including the investigation of microbial degradation of simple alicyclic hydrocarbons" [109].

Dies steht im Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen. Zwar gelang es, verschiedene Alkane, Arene, Campher und Coumarin verwertende Bakterienstämme zu isolieren, doch waren sämtliche Anreicherungsversuche mit Tetralin, Decalin oder Cyclohexan als alleiniger Kohlenstoffquelle erfolglos. Dabei wurde versucht, besonderen Nährstoffansprüchen potentieller Tetralinverwerter gerecht zu werden: Die Tetralinkonzentration wurde variiert zwischen 0,05 und 1,0%; 4 verschiedene Nährsalzlösungen, die zum Teil zusätzlich mit Spurenelementen, Vitaminen, Pepton oder Hefeextrakt angereichert waren, wurden verwendet. Außerdem wurde versucht, in Exsiccatoren natürliche Selektionsbedingungen über einen Zeitraum von 12 Monaten nachzuahmen. Die prinzipielle Eignung dieser angewandten Methoden wurde dadurch bewiesen, daß es - in Gegenwart von Tetralin - gelang, Bakterien zu isolieren, die u.a. Octan, Hexadecan oder Naphthalin verwerten können (siehe S.37f). Tetralin wirkte demnach zumindest auf eine Reihe von Kohlenwasserstoffverwertern nicht bakterizid.

Folgende Gründe kommen dafür in Betracht, daß kein Tetralinverwerter gefunden wurde:

1. In den 32 Boden- und Wasserproben war kein Tetralinverwerter enthalten:

   Der mikrobiellen Verwertbarkeit von Tetralin wurden bisher keine eingehenden Untersuchungen gewidmet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß Tetralin aufgrund seiner Struktur gegenüber dem enzymatischen Angriff resistent ist. Diese Vermutung wird unterstützt durch Ergebnisse besonders ausführlicher Untersuchungen über den mikrobiellen Abbau von u n s u b s t i t u i e r t e n Cycloalkanen, wie Cyclohexan und Decalin: Pelz und Rehm fanden in 250 Bodenproben und unter mehr als 50 Bakterienstämmen, die Kohlenwasserstoffe verwerten, keinen einzigen Decalinverwerter[75,76]; ebenso erfolglos wurden von Beam und Perry über 100 Kohlenwasserstoffverwerter aus Stammsammlungen auf die Cyclohexanverwertung geprüft[7]. Daraus wird ersichtlich, daß nicht unbedingt ein Zusammenhang besteht zwischen der Fähigkeit von Mikroorganismen, mit Cycloalkanen und mit n-Alkanen zu wachsen. Es bedarf möglicherweise der Evolution besonderer Abbauwege für den Cycloalkan- und Tetralinabbau.

2. Die untersuchten Proben enthielten zwar Tetralinverwerter; diese wurden aber aus den nachstehenden Gründen nicht entdeckt:

   a) Eine Mischpopulation, die Tetralin vielleicht durch Commensalismus und Cooxidation verwerten konnte, hatte gegenüber einem Stamm, der Tetralin allein, vollständig, aber langsamer abbaute, einen Wuchsvorteil; letzterer wurde folglich beim Überimpfen ausverdünnt: Bei den Anreicherungsversuchen (siehe III.2.,S.32ff) wurde Wachstum und Sauerstoffverbrauch von Mischkulturen in Gegenwart von Tetralin beobachtet. Beam und Perry[8] zeigten, daß Cyclohexan in einer Mischkultur von 2 Bakterienstämmen durch Cooxidation und Commensalismus als Kohlenstoffquelle verwertet wurde; wurden die beiden Stämme getrennt inkubiert, fand kein Wachstum statt.

   b) Beim Versuch, Tetralinverwerter auf Agarplatten d i r e k t zu isolieren (siehe Abb.12, S.34), wurden solche Kolonien nicht berücksichtigt, die auch auf Kontrollplatten ohne Tetralin wuchsen: Streng genommen ist nicht auszuschließen, daß Tetralin in solchen Fällen in d e m Maße verwertet wird, wie auf Kontroll-

platten CO_2 oder Verunreinigungen. Zur Klarstellung wäre hier der Nachweis des Tetralinverbrauchs und der Umwandlung in Zellmasse mit Hilfe umfangreicher Versuche in Flüssigkulturen nötig. Dies erschien jedoch nicht sinnvoll, weil auf diese Weise isolierte Bakterien wegen des langsamen Wachstums weder für die Grundlagenforschung noch für die biotechnologische Anwendung interessant wären.

c) In der Anreicherungskultur wurden wachstumshemmende Stoffe gebildet, die nach dem Überimpfen - trotz Verdünnung - weiteres Wachstum verhinderten. Dieser Aspekt wird an anderer Stelle diskutiert.

Faktoren, die die bakterielle Verwertung von Kohlenwasserstoffen beeinflussen

Für die Untersuchung der bakteriellen Verwertung oder der Ursachen der Nichtverwertung von Tetralin blieb der Ausweg, den auch andere Arbeitsgruppen in Ermangelung von Cycloalkanverwertern beschritten haben[78,109]. Es sollte gezeigt werden, ob und wie Tetralin durch Alkane und Arene verwertende Bakterien transformiert wird. Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Versuchsdurchführung war die Kenntnis der für die verschiedenen Bakterienstämme geeigneten Wachstumsbedingungen. Dazu gehören, neben allgemein für die Vermehrung von Bakterien geeigneten, insbesondere solche Bedingungen, die (1) die optimale Erzeugung von Biomasse aus Alkanen und Arenen und (2) die Bildung von Tetralinoxidationsprodukten gewährleisten.

Die Experimente wurden mit in diesem Sinne bewährten Nährmedien in Fermentern oder Schikanenkolben durchgeführt. Zur Regulierung der Schaumbildung bei der Bakterienanzucht im Fermenter wurde ein mechanischer Entschäumer entwickelt. Dies war aus einer Reihe von Gründen erforderlich: Die Schaumbildung führte dazu, daß nicht genügend Zellmasse erzeugt werden konnte, daß Wachstums- oder Toxizitätsbestimmungsversuche nicht zweifelsfrei interpretiert werden konnten, oder daß die Substratabnahme in der Abluft nicht bestimmt werden konnte. Eine gleichmäßige, kontrollierte Schaumbildung bei möglichst vollständiger Durchmischung der gesamten Kultur ist sogar erwünscht, weil dadurch der Gasaustausch verbessert wird[10,23]. Die Anwendung chemischer Antischaummittel ist folglich abzulehnen. Da

diese koaleszenzfördernd sind, wirken sie der optimalen Sauerstoffverteilung entgegen. Außerdem ist die Emulgierung von Kohlenwasserstoffen, gefördert durch die Ausscheidung bakterieller Lipoproteine, Glykolipide und Fettsäuren, eine wichtige Voraussetzung für den Substrattransport und das Wachstum[69,80,109]. Dieser Prozeß sollte durch Antischaummittel, die die physikalischen Eigenschaften der Nährlösung stark verändern, nicht gestört werden. Mit dem mechanischen Entschäumer gelang es, ein Gleichgewicht zwischen Schaumbildung und Schaumzerstörung herzustellen; das Überschäumen von Zellen wurde verhindert.

Die besonderen technischen und analytischen Probleme, die beim Wachstum von Bakterien mit Kohlenwasserstoffen als Kohlenstoffquelle auftreten, sind aus der Literatur bekannt. Hug und Fiechter[47] bemerken in einer Veröffentlichung über Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Alkanverwertung einleitend: "Analytical problems in microbial experiments using hydrocarbons as the carbon source are notorious". So wurden in der vorliegenden Arbeit z.B. Trübungs- und Zellzahlbestimmungen dadurch erschwert, daß es beim Einsatz von flüssigen oder festen Kohlenwasserstoffen nicht gelang, reproduzierbare Proben zu entnehmen. Das hatte zur Folge, daß Wachstumskurven nicht einwandfrei interpretiert werden konnten. Die Schwankungsbreite war teilweise so groß, daß aus den Kurven nicht ablesbar war, ob eine oder mehrere Wachstumsphasen vorlagen (siehe Abb.24, S.64). Vergleiche mit den von anderen Autoren veröffentlichten Wachstumskurven zeigten, daß dies die Regel ist[46,69,74,79]. Es erwies sich bei der Interpretation als hilfreich, daß die Zellzahl und die Trübung parallel bestimmt wurden. So konnten die jeweils vorliegenden Wachstumsphasen unter Berücksichtigung beider Parameter besser erkannt werden. Für beide Arten der Messung galt: Je höher der Anteil an nicht gelöstem Kohlenwasserstoff, desto weniger reproduzierbar waren die Werte; starke Abweichungen vom erwarteten Kurvenverlauf waren die Folge. Die Emulgierung des Substrates ist wahrscheinlich dafür verantwortlich zu machen, daß die Trübungskurve fast ausnahmslos einen Wendepunkt in dem Bereich aufweist, wo aus der Zelltiterkurve noch die lag-Phase abzuleiten ist. Aus den Trübungskurven wurden jeweils etwas längere Generationszeiten ermittelt. Dies beruht darauf,

daß schon die Nährlösung o h n e Zellen eine Trübung aufweist. Mit zunehmender Emulgierung und infolge des Substratverbrauchs wird diese geringer[119]. Die lag-Phasen waren im Fermenter, vermutlich wegen der besseren Emulgierung, kürzer als im Schikanenkolben.

Für die Cooxidationsversuche mit Tetralin war es in erster Linie von Bedeutung, daß die verschiedenen Wachstumsphasen erkannt wurden, da diese, wie zahlreiche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten[2,18,46,63,64,103], die Metabolitbildung beeinflussen, und daß reproduzierbar die gewünschte Zellmenge erzeugt werden konnte. Die Flüchtigkeit der Kohlenwasserstoffe erforderte deshalb besondere Beachtung. Ein großer Teil der Substrate wurde in Abhängigkeit von der Belüftungsrate aus dem Fermenter verflüchtigt. Um eine vorzeitige Substratlimitierung zu verhindern, mußte ein entsprechender Überschuß eingesetzt bzw. nachgefüttert werden. Außerdem wurde die Säurebildung untersucht, da das erwartete Cooxidationsprodukt Tetralol-1 säurelabil ist. Vor allem bei der mikrobiellen Verwertung von Alkanen werden Fettsäuren gebildet, die zur Emulgierung des Substrats beitragen[67,69]. Vor Cooxidationsversuchen wurde die Nährlösung gegebenenfalls mit Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt.

Die bakterielle Transformation von Tetralin

Die Voraussetzungen für den bakteriellen Abbau von Tetralin lassen sich in 4 Fragen zusammenfassen:

1. Wirkt Tetralin auf die untersuchten Bakterienstämme antibakteriell?
2. Wird Tetralin von der Bakterienzelle aufgenommen?
3. Induziert Tetralin die Synthese von Enzymen zu seinem Abbau?
4. Gibt es Mono- und Dioxygenasen, die die Tetralinoxidation katalysieren; entstehen dabei antibakteriell wirkende Metabolite?

Toxizität. Die antibakterielle Wirkung vieler Kohlenwasserstoffe ist eine Funktion der angewandten Dosis und der aus der Molekülstruktur resultierenden Eigenschaften (z.B. Löslichkeit in Wasser oder Zellbestandteilen). Sie wird in Hemmversuchen quantitativ als T o x i z i t ä t bestimmt. In der Literatur wird vielfach der Begriff "Toxizität der Kohlenwasserstoffe" verwendet; damit ist die substanzbezogene antimikrobielle Wirkung ("inherent toxicity"[11a]) gemeint.

n-Alkane lösen sich um so besser in Wasser, je weniger C-Atome ihr Molekül enthält. Darauf wird es zurückgeführt, daß nur relativ wenige Mikroorganismen die kurzkettigen n-Alkane ($\sim C_9$) verwerten[80]. Trotz der so geringen Löslichkeit (siehe Tab.1, S.19) können Kohlenwasserstoffe wie Cyclohexan, Xylol oder Octan bereits unterhalb der Sättigungskonzentration antibakteriell wirken[18,46,118]. Vermutlich beeinträchtigen die lipophilen Kohlenwasserstoffe den auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhenden Zusammenhalt der Bilayer-Membranen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß P.aeruginosa AS 47 mit Octan nur wachsen kann, wenn das Substrat der Kultur dampfförmig zugeführt wird. Hier liegt Octan in einer Konzentration vor, die noch nicht antibakteriell wirkt. Dagegen wächst P.aeruginosa AS 47 mit Hexadecan auch, wenn die Nährlösung einen großen Überschuß an nicht gelöstem Substrat enthält.

Die antibakterielle Wirkung von Kohlenwasserstoffen kann auf verschiedene Weise aufgehoben werden, durch Verringerung der Konzentration an gelöstem Substrat oder dadurch, daß man den Kontakt der Bakterienzellen mit dem reinen, ungelösten Kohlenwasserstoff verhindert[18,46]. Wie Gibson[33] zeigte, konnte ein Ethylbenzol verwertender P.putida-Stamm nur isoliert werden, nachdem das Substrat als Dampf in die Kultur eingeleitet wurde. Stirling et al.[100] gelang es, mit derselben Methode einen Cyclohexanverwerter zu isolieren. Andere Arbeitsgruppen setzten das Substrat als Flüssigkeit ein, verringerten aber den Molenbruch von Cyclohexan oder Octan, indem sie einen inerten, nicht antibakteriell wirkenden Kohlenwasserstoff, wie Isooctan oder Heptamethylnonan hinzufügten[18,118]. Dieser Effekt könnte auch zur Interpretation des folgenden Versuchs herangezogen werden: Das Wachstum von A.faecalis AS 72 mit dampfförmig zugeführtem Octan wurde durch Zugabe von flüssigem Tetralin 4 Stunden lang gehemmt; danach wuchsen die Bakterien bis zum gleichen Zelltiter wie die nur mit Octan gewachsene Kultur. Es wäre denkbar, daß in den 4 Stunden Octandampf in das flüssige Tetralin diffundierte und daß der Molenbruch des in der Nährlösung gelösten Tetralins soweit verringert wurde, daß Tetralin nicht mehr das Wachstum hemmen konnte.

Die Tetralintoleranz der hier verwendeten Bakterienstämme widerspiegelt die Bedingungen des jeweiligen Stammisolierungsverfahrens: A.faecalis AS 72 wurde - nach einer Exsiccatorvoranreicherung in

Gegenwart von dampfförmigem Tetralin - mit Octan als selektiver Kohlenstoffquelle isoliert; eine bakterizide Wirkung von flüssigem Tetralin wurde nicht festgestellt. P.stutzeri AS 70 wurde direkt von der Platte in Gegenwart von dampfförmigem Campher, ohne vorherigen Kontakt mit Tetralin, isoliert. Für diesen Stamm war sogar dampfförmig zugeführtes Tetralin bakterizid. P.stutzeri AS 39 und P.aeruginosa AS 47 wurden in Gegenwart von flüssigem Tetralin isoliert. Bei Inkubation mit Tetralindampf vermehrten sich diese Stämme um den Faktor 3 bis 4, wenn sie zuvor mit Naphthalin angezogen wurden.

Der physikalische Zustand und die Konzentration der Kohlenwasserstoffe hatten sich als kritische Momente für die Verwertbarkeit erwiesen. Sie erschienen für die Untersuchung des Tetralinabbaus bzw. für die Erfolgsaussichten, den bakteriellen Abbau von Tetralin nachzuweisen, grundlegende Bedeutung zu haben. Auch Hosler und Eltz [46] fordern nach eingehenden Untersuchungen über den Einfluß der Substratkonzentration auf die Cooxidation von Xylol: "Conditions must be tailor-made for the microbe involved". Nachdem Cooxidationsversuche mit flüssigem Tetralin erfolglos geblieben waren, wurde daher mit Hilfe der Methode der dampfförmigen Substratzufuhr weiter nach Tetralinoxidationsprodukten gesucht.

Der Nachteil der bislang in der Literatur beschriebenen Anwendungen dieses Verfahrens liegt darin, daß die der Bakterienkultur zur Verfügung stehende Substratkonzentration nicht bekannt ist. Man läßt die Kohlenwasserstoffe entweder im Luftraum über der Kultur verdampfen oder leitet sie über die Zuluft mit einer willkürlich festgelegten Strömungsrate in die Kulturflüssigkeit ein [33,100]. Positive Resultate bei Wachstums-, Cooxidations- oder Anreicherungsversuchen hängen dann von dem Zufall ab, daß der Kohlenwasserstoff einen hinreichenden Dampfdruck hat, um die Kultur zu versorgen, gleichzeitig jedoch nicht so groß ist, um bereits antibakteriell zu wirken. Die Kohlenwasserstoffkonzentration sollte deshalb, auch bei dampfförmiger Zufuhr im Strömungssystem, bestimmbar und fein dosierbar sein. In der Industrie werden Kohlenwasserstoffanalysatoren mit Ultraviolett- oder Flammenionisationsdetektoren benutzt, um Kohlenwasserstoffe in der Abluft von Großfermentern (>500 l) zu bestimmen [46]. Für eine weniger aufwendige Durchführung im Labormaß-

stab lagen keine Beispiele vor. Mit Hilfe der in III.1.3., S.25ff beschriebenen Kartuschentechnik konnte bei Wachstums- und Cooxidationsversuchen Naphthalin und Tetralin im Strömungssystem quantitativ bestimmt werden.

Transport. Die Art des Transports von Kohlenwasserstoffen in die Bakterienzelle ist noch nicht geklärt. Das Wachstum mit Kohlenwasserstoffen als Kohlenstoff- und Energiequelle ist offensichtlich mit der Bildung besonderer Membranstrukturen und der Ausscheidung von solubilisierenden Agentien (Bioemulgatoren) verbunden, die bei denselben Organismen nach Anzucht im Komplett- oder Succinatminimalmedium nicht auftreten[42,43,92,100,120]. Wenn sich die Emulgatoren als unerläßlich für den Transport von Kohlenwasserstoffen erweisen sollten, müßte man von "erleichtertem Transport" sprechen[80]. Nach Untersuchungen von Finnerty und Mitarbeitern[26,92] werden aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. Hexadecan und Naphthalin) u n v e r ä n d e r t durch gram-negative Bakterienzellen aufgenommen. Dabei unterscheidet sich die Cytoplasmamembran beim Wachstum mit Kohlenwasserstoffen in einer Reihe von physikalischen und biochemischen Eigenschaften von Membranen, die beim Wachstum mit "gewöhnlichen" Kohlenstoffquellen synthetisiert werden; zusätzlich entstehen im Cytoplasma von Monolayer-Membranen umgebene Kohlenwasserstoffeinschlüsse[26]. Elektronenmikroskopische Beobachtungen zeigten vergleichbare Strukturen bei einem Nocardia-Stamm nach dem Wachstum mit Cyclohexan; das Substrat wurde den Zellen hier als Dampf zugeführt[100]. Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, daß das strukturell mit Naphthalin und Cyclohexan verwandte Tetralinmolekül problemlos von Bakterien aufgenommen wird. Die Verwertbarkeit von Tetralin durch P.stutzeri AS 39 unter Cooxidationsbedingungen beweist, daß die Substrataufnahme zumindest s o möglich ist.

Induktion. Eine wichtige Bedingung für den Totalabbau von Tetralin scheint bei den untersuchten Bakterienstämmen nicht erfüllt zu sein: die Fähigkeit von Tetralin, als I n d u k t o r für die Synthese geeigneter Abbauenzyme zu fungieren. - Die Eignung von Enzymen für die Tetralinoxidation wird weiter unten diskutiert. - In Wachstumsversuchen mit 40 neu isolierten Bakterienstämmen sowie mit 15 Kohlenwasserstoffverwertern aus 2 Stammsammlungen wuchsen die Organis-

men nicht an. D.h., entweder ist in diesen Bakterien kein induzierbarer Tetralinabbauweg vorhanden, oder ein geeigneter Abbauweg ist vorhanden, wird aber nicht durch Tetralin induziert. Bei P.stutzeri AS 39 scheint letzteres der Fall zu sein; der Stamm konnte Tetralin bei gleichzeitiger Inkubation mit Naphthalin oder Salicylat zumindest teilweise als Kohlenstoffquelle verwerten. Soweit bekannt, stammt der einzige Hinweis darauf, daß Tetralin einen bakteriellen Abbauweg induziert von Hosler und Eltz[46]. Sie testeten die Fähigkeit ganzer Zellen von Nocardia corallina V-49 und Nocardia salmonicolor A-100, Xylol zu Dimethylmuconsäure zu transformieren: Benzol, p-Xylol, Tetralin, Biphenyl, Naphthalin und 2-Methylnaphthalin waren geeignete Induktoren. Über die Oxidation von Tetralin durch Dioxygenasen gibt es jedoch weder hier noch an anderer Stelle Hinweise. Der Befund sprach jedoch dafür, die Möglichkeit des Tetralinabbaus durch Arenverwerter genauer zu untersuchen.

Die Transformation und ihre kritischen Schritte. Der Zielsetzung dieser Arbeit folgend, wurde mehr Wert auf die Suche nach Metaboliten der Tetralinoxidation als auf die Untersuchung der Induzierbarkeit gelegt. Untersuchungen der Substratspezifität von bakteriellen Mono- und Dioxygenasen haben gezeigt, daß Bakterien nicht alle Substrate, die ihre Enzyme umsetzen, assimilieren können. Das Phänomen eines teilweisen Abbaus von Verbindungen durch Enzyme eines für die Assimilation anderer Substrate geeigneten Abbauwegs wird mit dem in der Literatur umstrittenen Begriff "Cometabolismus" bezeichnet[48,78]. In der Bakterienphysiologie und der Biotechnologie wird diese Fähigkeit der Bakterien in verschiedenen Versuchstechniken angewandt. (1) Bakterien werden mit einer geeigneten Kohlenstoffquelle (Wachstumssubstrat) angezogen; während des Wachstums ist ein Cosubstrat zugegen, das nur teilweise abgebaut wird[61].- (2) Bakterien werden mit einer geeigneten Kohlenstoffquelle angezogen, so daß die Enzyme eines bestimmten Abbauwegs induziert sind; danach wird in Abwesenheit des Wachstumssubstrats und eventuell auch der Stickstoffquelle das Cosubstrat hinzugegeben und entsprechend der Substratspezifität der Enzyme umgesetzt[44,45,90].

In A.faecalis AS 72 und P.aeruginosa AS 47 wurde durch Anzucht mit Octan der Alkanweg induziert. Weder durch Ruhezellen noch durch

wachsende Zellen dieser Stämme wurde Tetralin (als Flüssigkeit 10 bis 33 mM oder als Dampf zugesetzt) - in Gegenwart oder in Abwesenheit des Wachstumssubstrats - transformiert. Unter vergleichbaren Bedingungen wurde z.B. Cyclohexan durch P.aeruginosa Stamm T zu Cyclohexanol oxidiert[18]. Das Auftreten von Metaboliten wird durch zahlreiche Faktoren beeinflußt, u.a. durch die Konzentration des Wachstums- und Cosubstrats, den Zeitpunkt der Cosubstratzugabe oder die Zelldichte[2,18,46,63,64,81,82,103]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß unter anderen Bedingungen, als den hier gewählten, dennoch Tetralol-1 oder andere, dem Alkanweg entsprechende Produkte gebildet werden.

Ein bedeutender Effekt scheint von der Substratzugabe auszugehen, wie die Wachstumsversuche mit Alkanverwertern zeigten. Selbst bei Zugabe von Octan zu einer Kultur von A.faecalis AS 72, die bereits mit diesem Substrat wuchs, stagnierte das Wachstum (siehe Abb.14c, S.47). In anderen Versuchen wurde Octan am Anfang der exponentiellen Phase nachgefüttert, ohne daß das Wachstum beeinträchtigt wurde. Die Hexadecanzugabe hemmte das Wachstum von P.aeruginosa AS 47 in verschiedenen Abschnitten der exponentiellen Phase, allerdings nur vorübergehend (siehe Abb.25, S.66). Ähnliche Effekte beobachteten auch andere Arbeitsgruppen[83,91]; die Hintergründe des Phänomens sind jedoch nicht genauer untersucht worden. Es wäre nicht verwunderlich, wenn allein durch die Zugabe von Tetralin als Cosubstrat ebenfalls ein hemmender Einfluß, abhängig u.a. von der jeweils vorliegenden Wachstumsphase, auf die Zellen ausgeübt würde. Eine drastische Verringerung bzw. die vollständige Hemmung der Metabolitbildung wäre die Folge, obwohl Tetralin prinzipiell - wie Octan oder Hexadecan - abbaubar wäre.

Aus dieser Sicht scheint ein Versuchssystem aussichtsreicher, mit der die bakterielle Tetralinverwertung durch Arenverwerter in dieser Arbeit untersucht werden sollte. Hier wird die Metabolitbildung, bewährten Verfahren entsprechend, über den gesamten Verlauf des Bakterienwachstums verfolgt[16]. Das nicht als alleinige Kohlenstoffquelle verwertbare Tetralin wird mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit als Dampf durch die bereits beimpfte Nährlösung geleitet. Erst nachdem das Versuchssystem mit Tetralin gesättigt ist, wird

ein Wachstumssubstrat zugesetzt, das den zu untersuchenden Abbauweg induzieren soll. Die Versuchsergebnisse - resultierend aus Substrat- und Cosubstratabnahme sowie dem Verlauf des Zellwachstums und der Produktbildung zeigen dann: (1) wenn die Zellen nicht anwachsen, daß eine der gewählten Bedingungen (z.B. Tetralinströmungsrate) für die Tetralintransformation nicht geeignet ist (negative Kontrolle); (2) wenn die Zellen anwachsen (positive Kontrolle), ob zu irgendeiner Wachstumsphase Tetralin aufgenommen und zu Produkten transformiert wird, ob das Wachstumssubstrat vollständig verwertet wird und wenn eine Massenbilanzierung durchführbar ist, ob das C o substrat teilweise oder ganz in Zellmasse umgewandelt wird.

Ein nicht zu unterschätzender organisatorischer bzw. versuchstechnischer Aspekt ist folgender: Bei Versuchen zur Optimierung der Produktbildung werden das System hemmende Faktoren eher erkannt; man kann nach positiven Cooxidationsbedingungen selektionieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung des hier vorgestellten Versuchssystems, wie in III.4.3.2. (S.86) beschrieben, unter Beweis gestellt. Während des Wachstums von P.stutzeri AS 39 mit Salicylat wurde Tetralin zu Tetralol-1 und Tetralon-1 transformiert.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse soll eine vorläufige Abschätzung der Möglichkeiten des bakteriellen Tetralinabbaus vorgenommen werden. Die spärlichen Hinweise auf Metabolite (siehe Tab.11, S.103) ergeben, zusammen mit den Befunden über Toxizität oder Hemmung und unter Berücksichtigung bekannter Abbauwege strukturverwandter Kohlenwasserstoffe folgendes Bild: Tetralin hemmte die Assimilation von Wachstumssubstraten wie Octan oder Hexadecan. Ein möglicher Mechanismus der Hemmung der Alkan-Monooxygenase und der Alkoholdehydrogenase durch intermediär auftretende Alkanole wurde von Hammer und Liemann[40] beschrieben. Es bedürfte weiterer Untersuchungen, um festzustellen, ob dies der Grund für das Ausbleiben der Tetralinoxidation z.B. durch P.aeruginosa AS 47 ist. Hier wurde beim Wachstum mit Octan in Gegenwart von Tetralin Octanol-1 angereichert. Auch andere - nicht identifizierte Bestandteile der Nährlösung, wie z.B. Fettsäuren, könnten die Hemmung des Wachstums z.B. von

Tab.11: Produkte der bakteriellen Verwertung von Kohlenwasserstoffen

Enzym	Methylen-5exo-Hydroxylase	Alkan-Monooxygenase		Aren-Dioxygenase		Cycloalkan-Monooxygenase (postuliert) a)
Substrat	D + Campher	Octan		Naphthalin		Tetralin
Organismus	P.stutzeri AS 70	A.faecalis AS 72	P.aeruginosa AS 47	P.aeruginosa AS 47	P.stutzeri AS 39	P.stutzeri AS 39
Produkt des Wachstums- oder Cosubstrats	n.b.	n.g.	Octanol-1	n.g.	n.g.	Tetralol-1 ↓ b) (Tetralon-1)

n.b. nicht bestimmt
n.g. bei den in III.4. (S.79 - 90) beschriebenen Versuchen nicht gefunden

a) Trudgill postulierte eine Cycloalkan-spezifische Oxygenase für die Transformation von Cyclohexan zu Cyclohexanol[109]

b) Alkoholdehydrogenase

A.faecalis AS 72 verursachen. Aus denselben Gründen könnten bereits die Versuche, Tetralinverwerter zu i s o l i e r e n, erfolglos geblieben sein. Da Tetralin auf den Campherverwerter P.stutzeri AS 70 anscheinend u n m i t t e l b a r bakterizid wirkte, wurden mit diesem Stamm keine Cooxidationsversuche durchgeführt.

Tetralin steht aufgrund seiner Struktur zwischen den Klassen der aromatischen und der alicyclischen Kohlenwasserstoffe. Ein mikrobieller Angriff des Moleküls ist deshalb denkbar (1) durch die Monooxygenase eines Alkanverwerters (der z.B. Cyclohexan zu Cyclohexanol oxidiert[18]) oder (2) durch die Dioxygenase eines Arenverwerters (der z.B. Benzo(a)anthracen zum cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydro-Derivat oxidiert)[37]. Alkanverwerter hätten dementsprechend Tetralole und Tetralone, Arenverwerter hätten Tetralindiole bilden müssen. Diese Annahme wurde nicht bestätigt. Umso überraschender ist das Auftreten von Tetralol-1 und Tetralon-1 bei der Inkubation von P.stutzeri AS 39 (Ruhezellen und wachsende Zellen) mit Tetralin. Dieser Stamm verwertet keine Alkane. Zahlreiche substituierte Arene werden zwar auch von Monooxygenasen, wie der Salicylathydroxylase, umgesetzt; diese kommt aber nach allem, was über die Substratspezifität bekannt ist, ebenso wenig wie die Naphthalindioxygenase für die Bildung von Tetralol-1 in Betracht[34,55,104,115]. Untersuchungen, bei denen Tetralin als Substrat für diese Enzyme eingesetzt wurde, liegen allerdings nicht vor. Bei der Vermehrung von P.stutzeri AS 39 mit Salicylat, das auch den Naphthalinweg induziert (siehe S.54), nahm die Tetralolbildungsrate gegenüber der Zellzunahmerate überproportional zu. Das spricht dafür, daß das verantwortliche Enzym durch Salicylat, Tetralin oder ein Folgeprodukt induzierbar ist. Es ist nicht ungewöhnlich, daß während der Assimilation eines Wachstumssubstrats (z.B. Hexadecan) durch das Cosubstrat (z.B. Xylol) ein zweiter Abbauweg induziert wird, der von dem zuerst induzierten unabhängig ist[46]. Die Akkumulation von Metaboliten ist oft ein Anzeichen für die kritische Verlangsamung der jeweils folgenden enzymatischen Reaktion[16,90]. Für den Tetralinabbau durch P.stutzeri AS 39 könnte das bedeuten, daß die Lactonbildung oder die Spaltung der alicyclischen Molekülhälfte gemäß dem in Abb.34 vorgeschlagenen Weg erschwert oder nicht möglich ist. Die Stagnation des Wachstums von P.stutzeri AS 39 mit Tetralin als alleiniger

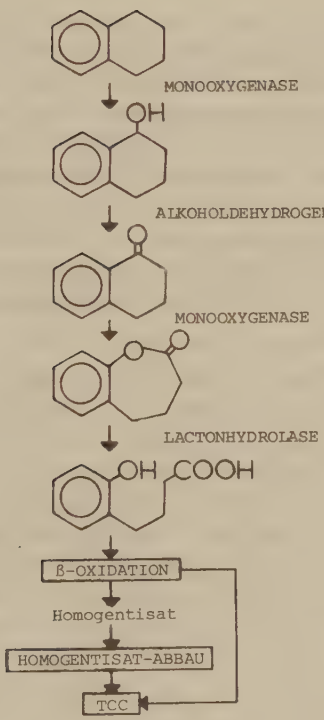


Abb.34: Postulierter Abbau von Tetralin durch P.stutzeri AS 39

Die in III.4.3.2. (S.86) nachgewiesenen Produkte werden entsprechend dem Cyclohexanol-Abbau[19] nach der Lactonisierung des alicyclischen Rings gespalten; 4-Phenyl-(2'-hydroxy-)-butyrat[51] wird über ß-Oxidation und Homogentisinsäure-Abbau[15] zu Metaboliten des TCC abgebaut.

Kohlenstoff- und Energiequelle nach etwa 2 Generationen wäre daher einleuchtend. Die dabei auftretende Braunviolettfärbung des Mediums könnte die Folge einer - eventuell gleichzeitig ablaufenden - Oxidation durch die Naphthalindioxygenase sein. Die dabei entstehende Dihydroxyverbindung, kann, wenn sie nicht weiter umgesetzt wird, rasch autokatalytisch zum toxischen ortho-Chinonderivat reagieren[36]. Der Abbau von Tetralin sollte dann spätestens nach einer erfolgten Ringspaltung unterbrochen werden. Das Produkt der Cycloalkanspaltung scheint eher verwertbar, zumal das Ringspaltungsprodukt bei der Cooxidation von Tetralin durch Nocardia corallina V-49 auftritt[51].

Eine großtechnische Anwendbarkeit der mikrobiellen Tetralol-1-Herstellung kann mit Hilfe der bisher vorliegenden Ergebnisse nicht vorausgesagt werden. Da das Produkt, wie alle Alkohole, relativ toxisch ist, dürfte eine Optimierung der Tetralolausbeute zu einer Inaktivierung oder Abtötung der Bakterien führen. Wenn es jedoch gelänge, z.B. in einem kontinuierlichen Verfahren, die Tetralol-1-konzentration in der Nährlösung niedrig zu halten, oder durch Mutagenisierung Tetralol-1 tolerierende Organismen zu erzeugen, erschiene eine Optimierung aussichtsreicher.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Alle Versuche, aus 32 Boden- und Wasserproben Bakterien zu isolieren, die mit Tetralin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, waren vergeblich. Von 40 isolierten, andere Kohlenwasserstoffe und Kohlenwasserstoffderivate verwertenden Bakterienstämmen wurden vorläufig taxonomisch bestimmt: Pseudomonas stutzeri AS 39 (Naphthalin), Pseudomonas aeruginosa AS 47 (Naphthalin, Octan), Pseudomonas stutzeri AS 70 (Campher) und Alcaligenes faecalis AS 72 (Octan).

2. Die Fähigkeit dieser Kohlenwasserstoffverwerter, Tetralin zu Tetralol-1 oder anderen Produkten zu transformieren (Cooxidation), wurde untersucht. Zu diesem Zweck wurden geeignete physiologische und versuchstechnische Bedingungen ermittelt. Antibakterielle Einflüsse der verwendeten Kohlenwasserstoffe wurden dadurch verringert, daß diese dampfförmig über die Zuluft in die Kultur eingeleitet wurden. Die Substrataufnahme im Strömungssystem wurde mit einem Kartuschenadsorptionsverfahren bestimmt. Für die Bekämpfung der Schaumbildung im Fermenter wurde ein mechanischer Entschäumer entwickelt.

3. Die bakterielle Verwertbarkeit von Tetralin wurde untersucht mit einem Alkan- und einem Naphthalinverwerter (A.faecalis AS 72 und P.stutzeri AS 39) sowie mit einem Stamm, der Alkane und Naphthalin (P.aeruginosa AS 47) verwertet. Bakterien, in denen durch Anzucht mit Octan die Enzyme des Alkanabbauwegs induziert worden waren, transformierten Tetralin nicht. - Tetralin wurde durch Zellen von P.stutzeri AS 39 als Wachstumssubstrat nur dann verwertet, wenn gleichzeitig ein Substrat (Naphthalin oder Salicylat) zugegen war, das die Enzyme des Naphthalinabbauwegs induzierte. Mit Salicylat wachsende Zellen dieses Stammes transformierten Tetralin zu Tetralol-1 und Tetralon-1.

VI. LITERATUR

1. Anderson, M.S., Hall. R.A., Griffin, M.
Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons: Cyclohexane catabolism by a pure strain of Pseudomonas sp.
J.Gen.Microbiol. 120,89-94(1980)

2. Asperger, O., Aurich, H.
Anwendung polarografischer O_2-Messungen auf die Veratmung von n-Alkanen und deren Derivaten durch Acinetobacter calcoaceticus; Z.Allg.Mikrobiol. 17,419-427(1977)

3. Azoulay, E., Heydeman, M.T.
Extraction and properties of alcohol dehydrogenase from Pseudomonas aeruginosa
Biochim.Biophys.Acta 73,1-6(1963)

4. Baptist, J.N., Gholson, R.K., Coon, M.J.
Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system.
I. Products of octane oxidation
Biochim.Biophys.Acta 69,40-47(1963)

5. Barnsley, E.A.
The induction of the enzymes of naphthalene metabolism in Pseudomonads by salicylate and 2-amino-benzoate
J.Gen.Microbiol. 88,193-196(1975)

6. Barnsley, E.A.
Role and regulation of the ortho and meta pathways of catechol metabolism in Pseudomonads metabolizing naphthalene and salicylate; J.Bacteriol. 125,404-408(1976)

7. Beam, H.W., Perry, J.J.
Co-metabolism as a factor in microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons
Arch.Mikrobiol. 91,87-90(1973)

8. Beam, H.W., Perry, J.J.
Microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons via co-metabolism and commensalism
J.Gen.Microbiol. 82,163-169(1974)

9. Beilstein, F.
Handbuch der organischen Chemie, 4. Aufl., Springer Verlag Berlin, E II 6,541(1944)

10. Bergwerksverband GmbH
Mechanischer Entschäumer für Gas-/Flüssigkeitsreaktoren
Deutsches Patent; Anmeldung: P 29 38 668.3 (1979)

11. Bergwerksverband GmbH
Mechanischer Entschäumer für Gas-/Flüssigkeitsreaktoren
Europapatent; Anmeldung: 80 200 88 9.6 (1980)

11a. Calder, J.A., Lader, J.H.
Effect of dissolved aromatic hydrocarbons on the growth of marine bacteria in batch culture
Appl.EnvironMicrobiol. 32,95-101(1976)

12. Christova, K., Dantschev, D.
Derivatives of 2-amino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene. V: Synthesis of trans-2-amino-3,5,8-trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene and N-substituted derivatives
Arch.Pharmazie 311,948-953(1978)

13. Colla, C., Treccani, V.
Metabolismo ossidativo microbico degli idrocarburi ciclic saturi. Nota I: Riconoscimento dell'acido adipico come intermedio dell'ossidazione della decalina
Ann.Microbiol.Enzimol. 10,77-81(1960)

14. Collin, G.
Steinkohlenteer - Kohlenwasserstoffe. Zusammenhänge zwischen Eigenschaften und Verwendung
Erdöl und Kohle-Erdgas-Petrochemie 32,512-519(1979)

15. Crawford, R.L., Frick, T.D.
Rapid spectrophotometric differentiation between glutathione-dependent and glutathione-independent gentisate and homogentisate pathways
Appl.Environ.Microbiol. 34,170-174(1977)

16. Dagley, S., Chapman, P.J.
Evaluation of methods used to determine metabolic pathways
in: J.R. Norris, D.W. Ribbons (ed). Methods in Microbiol.
6A,217-268(1971)
Academic Press, London

17. Davies, J.I., Evans, W.C.
Oxidative metabolism of naphthalene by soil Pseudomonads:
The ring-fission mechanism
Biochem.J. 91,251-261(1964)

18. De Klerk, H., Van Der Linden, A.C.
Bacterial degradation of cyclohexane. Participation of a
co-oxidation reaction
Antonie van Leeuwenhoek, J.Microbiol. 40,7-15(1974)

19. Donoghue, N.A., Griffin, M., Norris, D.B., Trudgill, D.W.
The microbial metabolism of cyclohexane and related compounds
in: J.M. Sharpley, A.M. Kaplan (eds). Proc. 3rd Int.Biodegra-
dation Symp. p.43-56(1975)
Applied Science Publishers, London

20. Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W., Knackmuss, H.-J.
Isolation and characterisation of a 3-chlorobenzoate
degrading Pseudomonad
Arch.Microbiol. 99,61-70(1974)

21. Dunn, I.J.
An interfacial kinetics model for hydrocarbon oxidation
Biotechnol.Bioeng. 10,891-894(1968)

22. Einsele, A., Fiechter, A.
Liquid and solid hydrocarbons
in: T.K. Ghose and A. Fiechter (eds). Adv.Biochem.Eng.
Vol.1,169-194(1971). Springer Verlag, Berlin

23. Eschweiler & Co.
"Schaumabscheider für Fermenter"
Deutsches Patent; Offenlegungsschrift 27 19 112 (P 27 19 112.4);
(1978)

24. Evans, W.C., Fernley, H.N., Griffiths, C.
Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil Pseudomonads. The ring-fission mechanism
Biochem.J. 95, 819-831(1965)

25. Fasco, M.J., Cashin, M.J., Kaminsky, L.S.
A novel method for the quantitation of warfarin and its metabolites in plasma
J.Liquid.Chromatogr. 2,565-575(1979)

26. Finnerty, W.R.
The biochemistry of microbial alkane oxidation: new insights and perspectives
Trends Biochem. 2,73-75(1977)

27. Foster, J.W.
Bacterial oxidation of hydrocarbons
in: O. Hayaishi (ed). The Oxigenases, p.241-271(1962)
Academic Press New York

28. Frank, C.E.
Hydrocarbon autoxidation
Chem.Rev. 46,155-169(1950)

29. Fredricks, K.M.
Adaptation of bacteria from one type of hydrocarbon to another
Nature 209,1047-1048(1966)

30. Friello, D.A., Mylroie, J.R., Chakrabarty, A.M.
Use of genetically engineered multi-plasmid microorganism for rapid degradation of fuel hydrocarbons
in: J.M. Sharpley and A.M. Kaplan (eds). Proc. 3rd Internatl. Biodegradation Symp., p.205-214(1975)
Applied Science Publishers, London

31. Ganapathy, K., Khanchandami, K.S., Bhattacharyya, P.K.
Microbiological transformations of terpenes. Part VII. Further studies on the mechanism of fungal oxygenation reaction with the aid of model substrates
Indian J.Biochem. 3,66-70(1966)

32. Gebauer, R.
Die Verwertung aliphatischer Kohlenwasserstoffe durch ein neu isoliertes Bakterium. Dissertation, Göttingen (1974)

33. Gibson, D.T.
Initial reactions in bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt. B 162,157-168(1976)

34. Gibson, D.T.
Biodegradation of aromatic petroleum hydrocarbons
in: D.A. Wolfe (ed). Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine ecosystems and organisms, p.36-46(1977)
Pergamon Press, Oxford

35. Gibson, D.T.
Microbial metabolism
in: O. Hutzinger (ed). The handbook of environmental chemistry, p.161-192(1980); Springer Verlag, Berlin

36. Gibson, D.T., Koch, J.R., Kallio, R.E.
Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene
Biochemistry 7,2653-2662(1968)

37. Gibson, D.T., Mahadevan, V., Jerina, D.M., Yagi, H., Yeh, H.J.C.
Oxidation of the carcinogens benzo-(a)-pyrene and benzo-(a)-anthracene to dihydrodiols by a bacterium
Science 189,295-297(1975)

38. Goma, G., Pareilleux, A., Duran, D.C.
Cinétique de dégradation des hydrocarbures par Candida lipolytica. Arch.Mikrobiol. 88,97-109(1973)

39. Gunsalus, J.C., Pederson, T.C., Sligar, S.G.
Oxygenase-catalyzed biological hydroxylations
Ann.Rev.Biochem. 44,377-407(1975)

40. Hammer, K.D., Liemann, F.
Primäre Oxidationsmechanismen beim Abbau aliphatischer Kohlenwasserstoffe durch bakterielle Enzymsysteme
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt. B 162,169-179(1976)

41. Hartline, R.A., Gunsalus, I.C.
Induction specificity and catabolic repression of the early enzymes in camphor degradation by Pseudomonas putida
J.Bacteriol. 106,468-478(1971)

42. Hisatsuka, K., Nakahara, T., Sano, N., Yamada, K.
Formation of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa and its function in hydrocarbon fermentation
Agric.Biol.Chem. 35,686-692(1971)

43. Hisatsuka, K., Nakahara, T., Minoda, Y.
Formation of protein-like activator for n-alkane oxidation and its properties
Agric.Biol.Chem. 41,445-450(1977)

44. Horvath, R.S.
Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. Bacteriol.Rev. 36,146-155(1972)

45. Horvath, R.S., Flathman, P.
Co-metabolism of fluorobenzoates by natural microbial populations
Appl.Eviron.Microbiol. 31, 889-891(1976)

46. Hosler, P., Eltz, R.W.
Microbial conversion of p-xylene in stirred fermenters
in: D. Perlman (ed). Fermentation advances; p.789-805(1969)

47. Hug, H., Fiechter, A.
Assimilation of aliphatic hydrocarbons by Candida tropicalis.
I. Analytical problems in hexadecane batch experiments
Arch.Mikrobiol. 88,77-86(1973)

48. Hulbert, M.H., Krawiec, S.
Cometabolism: a critique
J.Theor.Biol. 69,287-291(1977)

49. Imelik, B.
Oxidation de cyclohexane par Pseudomonas aeruginosa
C.R.Soc.Biol. 226,2082-2083

50. Ivanov, I.C., Dantchev, D.K., Sulay, P.B.
Derivate des 2-Amino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalins. IV. Synthese und Konfiguration der Diastereomeren 2,3,4a,5,10,10a-Hexahydro-4-naphth-[2,3-b]-1,4-oxazine ("Naphthalanmorpholine")
Chem.Ber. 111,1164-1170

51. Jamison, V.W., Raymond, R.L., Hudson, J.O.
Hydrocarbon cooxidation by Nocardia corallina strain V-49
in: Amer.Inst. of Biol.Sciences (ed). Developments in Industrial Microbiology, p.99-105(1970)
Garmond-Pridemark Press, Baltimore, Maryland

52. Jeffrey, A.M., Yeh, H.I.C., Jerina, D.M., Patel, T.R., Davey, J.F., Gibson, D.T.
Initial reactions in the oxidation of naphthalene by Pseudomonas putida
Biochemistry 14, 575-584(1975)

53. Jerina, D.M., Daly, J.W., Jeffrey, A.M., Gibson, D.T.
cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene: a bacterial metabolite from naphthalene
Arch.Biochem.Biophys. 142,394-396(1971)

54. Johnson, F.H., Goodale, W.T., Turkevich, J.
The bacterial oxidation of hydrocarbons
J.Cell.Comp.Physiol. 19,163-171(1942)

55. Katagiri, M., Takemori, S.
The reaction mechanism of flavin-containing oxygenases
in: H. Kamin (ed). Flavins Flavoproteins 3,447-461(1971)
University Park Press, Baltimore, Butterworths, London

56. Kieslich, K.
Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.111-113(1976)

57. Kieslich, K.
Microbial transformations - Type-reactions
in: Antibiotics and other secondary metabolites. Biosynthesis and production. FEMS Symp. No.5, p.57-85(1978)

58. Kiyohara, H., Nagao, K., Nomi, R.
Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an Aeromonas sp. Agric.Biol.Chem. 40,1075-1082(1976)

59. Komagata, K., Nakase, T., Katsuya, N.
Assimilation of hydrocarbons by yeasts. I. Preliminary screening
J.Gen.Appl.Microbiol. 10,313-321(1964)

60. Ladd, J.N.
The oxidation of hydrocarbons by soil bacteria. I. Morphological and biochemical properties of a soil diphtheroid utilizing hydrocarbons. Aust.J.Biol.Sci. 9,92-104(1956)

61. Leadbetter, E.R., Foster, J.W.
Oxidation products formed from gaseous alkanes by the bacterium Pseudomonas methanica
Arch.Biochem.Biophys. 82,491-492(1959)

62. Marr, E.K., Stone, R.W.
Bacterial oxidation of benzene
J.Bacteriol. 81, 425-430(1961)

63. May, S.W., Schwartz, R.D.
Stereoselective epoxidation of octadiene catalyzed by an enzyme system of Pseudomonas oleovoranes
J.Amer.Chem.Soc. 96,4031-4032(1974)

64. May, S.W., Gordon, S.L., Steltenkamp, M.S.
Enzymatic epoxidation of trans,trans-1,8-dideuterio-1,7-octadiene. Analysis using partially relaxed proton Fourier transform nmr
J.Amer.Chem.Soc. 99,2017-2024(1977)

65. McAuliffe, C.D.
Solubility in water of paraffin, cycloparaffin, olefin, acetylene, cycloolefine and aromatic hydrocarbons
J.Phys.Chem. 70,1267-1275(1966)

66. McKenna, E.J., Coon, M.J.
Enzymatic ω-oxidation. IV. Purification and properties of the ω-hydroxylase of Pseudomonas oleovorans
J.Biol.Chem. 245,3882-3889(1970)

67. Miura, Y., Okazaki, M., Murakawa, S.-I., Hamada, S.-I., Ohno, K.
Assimilation of liquid hydrocarbon by microorganisms. II. Growth kinetics
Biotechnol.Bioeng. 19,715-726(1977)

68. Mrsny, R.J., Barles, R.W., Chin, D., Evevold, K.C., Thomas, B.R., Wheelis, M.L.
Use of an internal standard monitoring the bacterial degradation of crude oil
Appl.Environ.Micorbiol. 36,776-779 (1978)

69. Nakahara, T., Erickson, L.E., Gutierrez, J.R.
Characteristics of hydrocarbon uptake in cultures with two liquid phases. Biotechnol.Bioeng. 19,9-25(1977)

70. Nozaki, M.
Oxygenases and dioxygenases
in F.L. Boschke (ed). Topics in Current Chemistry 78, p.145-186(1979)
Springer Verlag, Berlin

71. Ooyama, J., Foster, J.W.
Bacterial oxidation of cycloparaffinic hydrocarbons
Antonie van Leeuwenhoek J.Microbiol.Serol. 31,45-65(1965)

72. Organikum
Autorenkollektiv. 10. Auflage VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, S.598(1971)

73. Palleroni, N.J., Doudoroff, M., Stanier, R.Y.
Taxonomy of the aerobic Pseudomonads: the properties of the Pseudomonas stutzeri group
J.Gen.Microbiol. 60,215-231(1970)

74. Pareilleux, A.
Hydrocarbon assimilation by Candida lipolytica: formation of a biosurfactant. Effects on respiratory activity and growth
Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol. 8,91-101(1979)

75. Pelz, B.
Untersuchungen über die Abbaubarkeit von Decalin durch Mikroorganismen. Diplomarbeit TH München (1970)

76. Pelz, B., Rehm, H.J.
Die Resistenz von Decalin gegenüber mikrobiellem Abbau
Arch.Mikrobiol. 77,288-290(1971)

77. Pelz, B.F., Rehm, H.J.
Isolierung, Substratassimilation und einige Produkte alkanabsondernder Schimmelpilze
Arch.Mikrobiol. 84,20-28(1972)

78. Perry, J.J.
Microbial cooxidations involving hydrocarbons
Microbiol.Rev. 43,59-72(1979)

79. Puklowski, W.-D., Rehm, H.J.
Sauerstoffeinluß auf die Citronensäure- und Biomassebildung einer alkanverwertenden Hefe
in: H.J.Rehm (ed). Biotechnologie. Dechema Monographien Band 81 p.165-175(1977). Verlag Chemie, Weinheim

80. Ratledge, C.
Degradation of aliphatic hydrocarbons
in: R.J. Watkinson (ed). Developments in biodegradation of hydrocarbons - I, p.1-46(1978)
Shell Research Limited, Shell Biosciences Laboratory, Sittingbourne, Kent, UK

81. Raymond, R.L., Jamison, V.W., Hudson, J.O.
Microbial hydrocarbon co-oxidation. I. Oxidation of mono- and dicyclic hydrocarbons by soil isolates of the genus Nocardia. Appl.Microbiol. 15,857-865(1967)

82. Raymond, R.L., Jamison, V.W., Hudson, J.O.
Hydrocarbon cooxidation in microbial systems
Lipids 6,453-457(1971)

83. Reineke, W.; persönliche Mitteilung (1980)

84. Riggin, R.M., Howard, C.C.
Determination of benzidine, dichlorobenzidine and diphenylhydrazine in aqueous media by high performance liquid chromatography. Anal.Chem. 51,210-214(1979)

85. Robinson, D.S.
Oxidation of selected alkanes and related compounds by a Pseudomonas strain
Antonie van Leeuwenhoek J.Microbiol.Serol. 30,303-316(1964)

86. Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., Gutnick, D.L.
Emulsifier of Arthrobacter RAG-1: isolation and emulsifying properties. Appl.Environ.Microbiol. 37,402-408(1979)

87. Rosenberg, E., Perry, A., Gibson, D.T., Gutnick, D.L.
Emulsifier of Arthrobacter RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate. Appl.Environ.Microbiol. 37,409-413(1979)

88. Schlegel, H.G.
Allgemeine Mikrobiologie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage; S.174(1974)

89. Schöberl, P.
Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an einem kohlenwasserstoffoxidierenden Pseudomonas Stamm aus der Elbe
Arch.Microbiol. 56,354-370(1967)

90. Schreiber, A., Hellwig, M., Dorn, E., Reineke, W.,Knackmuss, H.-J.
Critical reactions in fluorobenzoic acid degradation by Pseudomonas sp. B 13
Appl.Environ.Microbiol. 39,58-67(1980)

91. Schwartz, R.D., McCoy, C.J.
Enzymatic epoxidation: synthesis of 7,8-epoxy-1-octene, 1,2-7,8-diepoxyoctane, and 1,2-epoxyoctane by Pseudomonas oleovorans. Appl.Environ.Microbiol. 31,78-82(1976)

92. Scott, C.C.L., Finnerty, W.R.
A comparative analysis of the ultrastructure of hydrocarbon-oxidizing micro-organisms.
J.Gen.Microbiol. 94,342-350(1976)

93. Shamsuzzaman, K.M., Barnsley, E.A.
The regulation of naphthalene oxygenase in Pseudomonads
J.Gen.Microbiol. 83,165-170(1974)

94. Shaw, D.G.
Hydrocarbons in the water column
in: D.A. Wolfe (ed). Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine ecosystems and organisms, p.8-18(1977)
Pergamon Press, Oxford

95. Skarzynski, B., Czekalowski, J.W.
Utilization of phenols and related compounds by Achromobacter
Nature 158,304-305(1946)

96. Soli, G., Bens, E.M.
Bacteria which attack petroleum hydrocarbons in a saline medium
Biotechnol.Bioeng. 14,319-330(1972)

97. Soli, G., Bens, E.M.
Selective substrate utilization by marine hydrocarbonoclastic bacteria. Biotechnol.Bioeng. 15,285-297(1973)

98. Solomons, G.L., Perkin, M.P.
The measurement and mechanism of oxygen transfer in submerged culture. J.Appl.Chem. 8,251-259(1958)

99. Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., Doudoroff, M.
The aerobic Pseudomonas: a taxonomic study
J.Gen.Microbiol. 43,159-271(1966)

100. Stirling, L.A., Watkinson, R.J., Higgins, I.J.
Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons: isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium
J.Gen.Microbiol. 99,119-125(1977)

101. Studebaker, J.F., Slocum, S.A.
Enzymatic catalysis of a three step steroid conversion
Enz.Eng. 3,445-452(1978)

102. Sukatsch, D.A., Faust, U.
Berechnung von Etragskoeffizienten von Kohlenwasserstoff-Fermentationen
in: H.J.Rehm (ed). Biotechnologie. Dechema Monographien Band 81, p.197-215(1977). Verlag Chemie, Weinheim

103. Suzuki, T., Ogawa, K.
Transient accumulation of fatty alcohols by n-paraffin-grown microorganisms. Agric.Biol.Chem. 36,457-463(1972)

104. Takemori, S., Nakamura, M., Katagiri, M., Nakamura, T.
Kinetic analysis of salicylate hydroxylase reaction
in: H. Kamin (ed). Flavins Flavoproteins 3,463-473(1971)
University Park Press; Baltimore Butterworth, London

105. Tassin, J.P., Vandecasteele, J.P.
Separation and characterization of long-chain alcohol dehydrogenase isoenzyme from Pseudomonas aeruginasa
Biochim.Biophys.Acta 276,31-42(1972)

106. Tassin, J.P., Celier, C., Vandecasteele, J.P.
Purification and properties of a membrane-bound alcohol dehydrogenase involved in oxidation of long-chain hydrocarbons by Pseudomonas aeruginosa
Biochim.Biophys.Acta 315,220-232(1973)

107. Tausz, J., Peter, M.
Neue Methode der Kohlenwasserstoffanalyse mit Hilfe von Bakterien
Zentbl.Bakt.Parasitenkde., 2. Abtlg. 49,497-554(1919)

108. Telling, R.C., Stone, C.J.
A method of automatic pH-control of bicarbonate - CO_2 buffer system for the submerged culture of hamster kidney cells
Biotechnol.Bioeng. 6,147-158(1964)

109. Trudgill, P.W.
Microbial degradation of alicyclic hydrocarbons
in: R.J. Watkinson (ed). Developments in biodegradation of hydrocarbons-I,p.47-84(1978)
Shell Research Limited, Shell Biosciences Laboratory, Sittingbourne, Kent, UK

110. Tsuchii, A., Suzuki, T., Takahara, Y.
Microbial degradation of styrene oligomer
Agric.Biol.Chem. 41,2417-2421(1977)

111. Van Eyk, J., Bartels, T.J.
Paraffin oxidation in Pseudomonas aeruginosa. II. Gross fractionation of the enzyme system into soluble and particulate components
J.Bacteriol. 104,1065-1073(1970)

112. Van Ravenswaay Claasen, J.C., Van der Linden, A.C.
Substrate specifity of the paraffin hydroxylase of Pseudomonas aeruginosa
Antonie van Leeuwenhoek J.Microbiol.Serol. 37,339-352(1971)

113. Weast, R.C.
Handbook of Chem.Phys. Chemical Rubber Company (1976)
Cleveland, Ohio

114. Welch, W.M., Harbert, Ch.A., Sarges, R., Stratten, W.P., Weissman, A.
Analgesic and tranquilizing activity of 5,8-disubstituted 1-tetralone mannich bases
J.Med.Chem. 20,699-705(1977)

115. White-Stevens, R.H., Kamin, H.
Studies of a flavoprotein, salicylate hydroxylase. I. Preparation, properties, and the uncoupling of oxygen reduction from hydroxylation
J.Biol.Chem. 247,2358-2370(1972)

116. Wieland, Th., Griss, G., Haccius, B.
Untersuchungen zur mikrobiellen Benzoloxidation. I. Nachweis und Chemismus des Benzolabbaus
Arch.Mikrobiol. 28,383-393(1958)

117. Winkler, U., Rüger, W., Wackernagel, W.
Praktikum der Genetik, Band 1. Bakterien-, Phagen- und Molekulargenetik, S.213(1972)

118. Wodzinski, R.S., Johnson, M.J.
Yields of bacteral cells from hydrocarbons
Appl.Microbiol. 16,1886-1891(1968)

119. Yoshida, F., Yamane, T., Nakamoto, K.
Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. Biotechnol.Bioeng. 15,257-270

120. Zajic, J.E., Panchal, C.J.
Bio-emulsifiers. Crit.Rev.Microbiol. 5,39-66(1976)

121. Zuckerberg, A., Diver, A., Peeri, Z., Gutnick, D.L., Rosenberg, E.
Emulsifier of Arthrobacter RAG-1: chemical and physical properties. Appl.Environ.Microbiol. 37,414-420(1979)

VII. ANHANG

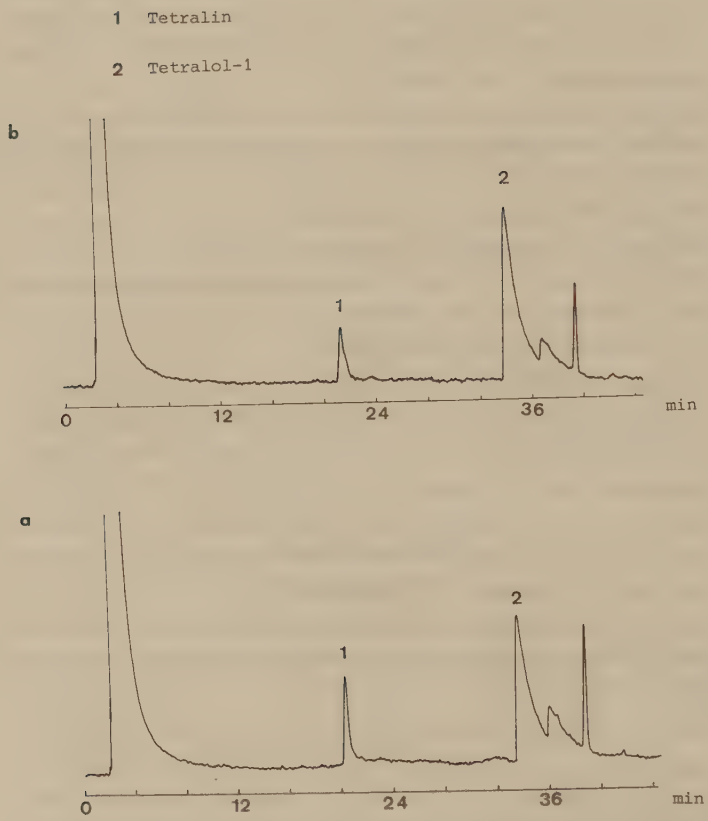


Abb.35: Gaschromatographischer Nachweis von Tetralol-1 im Kulturextrakt

Gerätekombination (GK):Aa; Temperaturprogramm (TP):1 (s. S. 17 u. 19)
Herkunft des Kulturextrakts siehe S. 79. Die Identifizierung erfolgte durch Cochromatographie einer Referenzlösung (35 b). Der Tetralol-1-Peak zeigte starkes "Tailing"; außerdem traten Zersetzungsprodukte auf (s. Abb.36). Silikongummi war deshalb nicht als stationäre Phase geeignet.

1 Zersetzungsprodukt

2 Tetralol-1

a

b

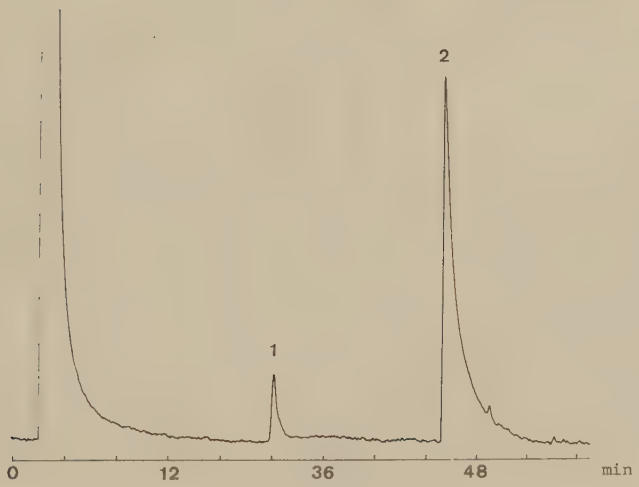
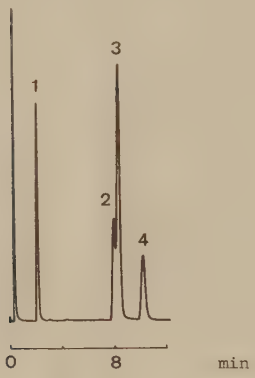


Abb.36: Zersetzung von Tetralol-1 während der gaschromatographischen Analyse

a) GK:Aa, TP:2; b) GK:Aa, TP:1 (s. S. 17 u. 23)
Die Zersetzung war vom gewählten Temperaturprogramm abhängig. Das Zersetzungsprodukt hatte nahezu dieselbe Retentionszeit wie Tetralin (bei TP:1).

1 Tetralin
2 Tetralon-1
3 Tetralon-2
4 Tetralol-1
5 Tetralol-5
6 Tetralol-6
7 5-Hydroxy-1-Tetralon

a



b

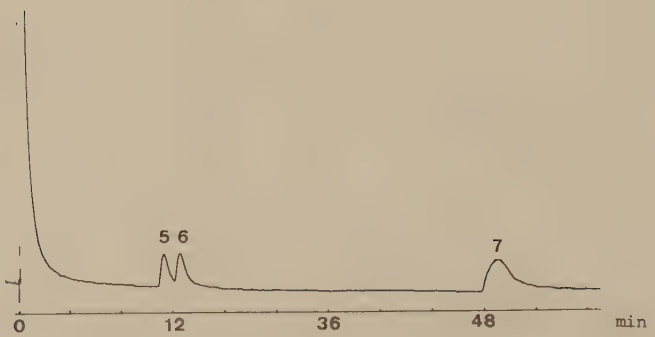


Abb.37: Gaschromatographischer Nachweis von Tetralin und Tetralinoxidationsprodukten (Referenzsubstanzen)
a) GK:Bb, TP:4 (s. S. 17 u. 23) b) GK:Ab, isotherm 200°

1 Tetralin

2 Naphthalin

3 Tetralon-1

4 Tetralon-2

5 Tetralol-1

Abb.38: Gaschromatographischer Nachweis von Naphthalin, Tetralin und Tetralinoxidationsprodukten (Referenzsubstanzen)

GK:Bb, TP:5 (s. S. 17 u. 23)

1 Tetralin

2 Tetralon-1

3 Tetralol-1

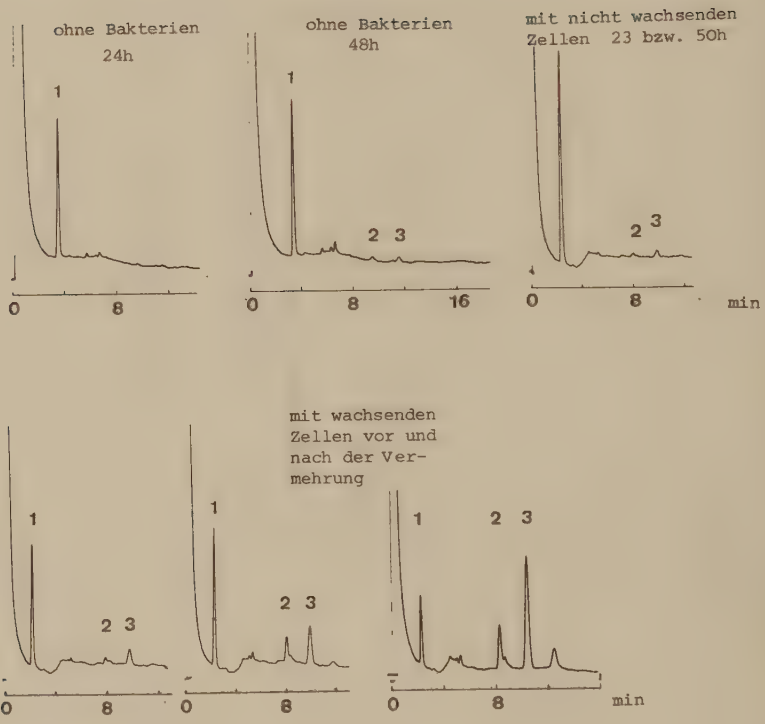


Abb.39: Gaschromatographischer Nachweis von Tetralin-oxidationsprodukten in Kartuscheneluaten

GK:Ab, TP:3 (s. S. 17 u. 23)
Herkunft der Kartuscheneluate siehe S. 24 und 86f

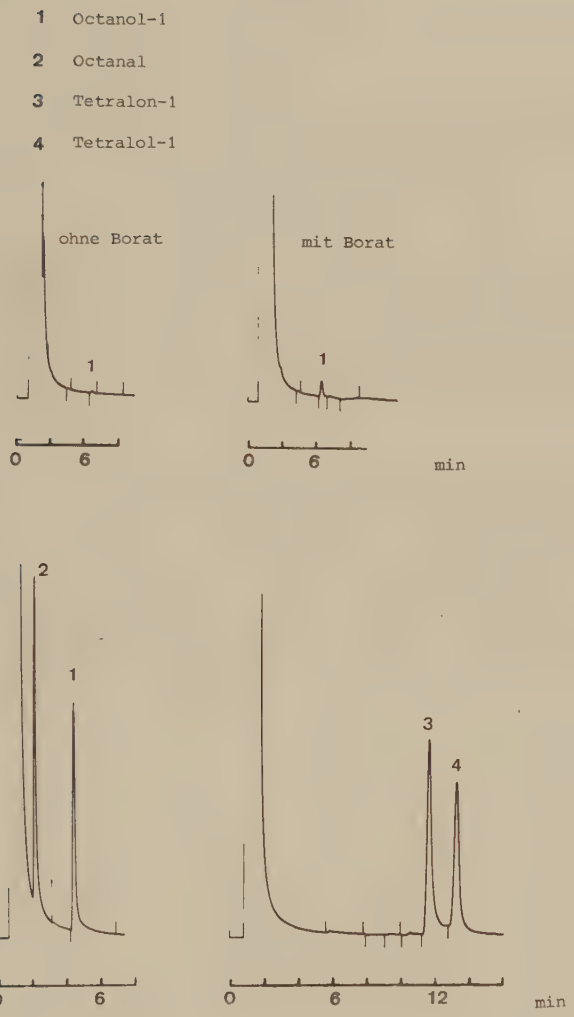


Abb.40: Gaschromatographischer Nachweis von Octanol-1 und Octanal in Kartuscheneluaten

a-c) GK:Bb, TP:6 d) GK:Bb, TP:7 (s. S. 17 u. 23)
Herkunft der Kartuscheneluate siehe S. 82. In Gegenwart von Tetralin und/oder Tetralinoxidationsprodukten wurde das Temperaturprogramm Nr. 7 gewählt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Winkler angefertigt. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas, für wertvolle Ratschläge und sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Den Herren Prof. Dr. W. Peters, Prof. Dr. G. Kölling und Dr. K. Handrick, Bergbau-Forschung GmbH, Essen, danke ich ganz besonders für die finanzielle Unterstützung, die Bereitstellung von Gaschromatographen, Laborgeräten und Testsubstanzen, sowie für ihre Anregungen und ihr Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ferner danke ich allen, die mir bei der Durchführung der Arbeit geholfen haben: Frau U. Stirnberg, Frau M. Stuckmann und Herrn C. Linden für ihre Hilfe bei einigen Experimenten, Herrn Dr. W. Reineke für experimentelle Ratschläge und wertvolle Diskussionsbeiträge, sowie für die Überlassung von Bakterienstämmen, Herrn Dr. A.M. Chakrabarty für die Überlassung einiger Bakterienstämme, sowie Herrn D. Ruffer für den Bau technischer Vorrichtungen für die Bakterienanzucht.

Lebenslauf

23.3.1951	geboren in Havelberg
1957-1961	Besuch der Volksschulen in Ernsthofen, Bad Oeynhausen und Köln-Sülz
1961-1969	Besuch des Gymnasiums in Salzgitter-Bad
1969	Abitur
	Immatrikulation an der Technischen Universität Braunschweig im Fach Chemie
1973	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
	Fortsetzung des Chemiestudiums an der Universität Göttingen
1974	Beginn der Experimente zur Diplomarbeit mit dem Titel: "Cometabolismus von Fluorbenzoaten: Physiologie des bakteriellen Abbaus und Isolierung von Metaboliten" am Institut für Mikrobiologie
1976	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
	Anschließend Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum

BAMBERG

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545/8791